BLAULICHTPHOTOREZEPTION UND VERSUCHE ZUR LICHTREAKTIVIERUNG VON NITRATREDUKTASE BEI *NEUROSPORA CRASSA*

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
LUTZ SCHEIDELER
aus Düsseldorf

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0063

Blaulichtphotorezeption und Versuche zur Lichtreaktivierung von Nitratreduktase bei *Neurospora crassa*

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Lutz Scheideler
aus Düsseldorf

1986

Tag der mündlichen Prüfung:	4. Juli 1986
Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Hinnemann
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. F. Jüttner

Ich spreche all denen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben, meinen herzlichen Dank aus:

Meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben;

Frau Prof. Dr. H. Ninnemann für die Überlassung des Themas und Bereitstellung des Arbeitsplatzes, ihre ständige Gesprächsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung sowie die zahlreichen Anregungen, die sie mir gab;

Frau Dr. D. Siefermann-Harms für ihre wissenschaftliche Beratung und Anteilnahme am Fortschritt meiner Arbeit;

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe und des Instituts, mit denen ich meine Probleme diskutieren konnte und deren Material und Geräte ich ausleihen bzw. benutzen durfte;

Herrn Prof. Dr. H. Metzner, an dessen Institut die Arbeit durchgeführt wurde;

Herrn Dr. Ch. Larsson von der Universität in Lund, der mich für einen Monat in sein Labor aufgenommen und betreut hat.

Der deutschen Forschungsgemeinschaft und der European Molecular Biology Organization danke ich für ihre finanzielle Unterstützung.

		Seite
EINLEITUNG		9
MATERIAL UND METHODEN		15
M 1.	Anzucht des Zellmaterials	15
M 1.1.	*Neurospora crassa* "slime"	15
M 1.2.	*Neurospora crassa* al-2 bd	15
M 2.	Proteinbestimmungen	16
M 2.1.	Modifizierte Lowry-Methode	16
M 2.2.	Proteinbestimmungen mit Coomassie Brilliant Blue	16
M 3.	Flavinversuche	17
M 3.1.	Aufarbeitung des Zellmaterials	17
M 3.2.	Anreicherung der Flavine durch Phenolextraktion	18
M 3.3.	Dünnschichtchromatographie	18
M 3.4.	Quantitative Bestimmung	18
M 4.	Versuche zur Isolierung von Plasmamembran	19
M 4.1.	Aufarbeitung des Zellmaterials	19
M 4.1.1.	Material für Versuche mit Dichtegradienten	19
M 4.1.2.	Material für "Partition"-Versuche im Tris-Citrat-Puffersystem	19
M 4.1.3.	Material für "Partition"-Versuche im Phosphat-Puffersystem	20
M 4.2.	Versuchsdurchführung	20
M 4.2.1.	Dichtegradienten	20
M 4.2.2.	"Phase partition" im Tris-Citrat-Puffersystem	21
M 4.2.3.	"Phase partition" im Phosphat-Puffersystem	22
M 4.2.4.	Maschineller Gegenstromlauf	24
M 4.3.	Plasmamembran-ATPase-Test	24
M 4.4.	Cytochromoxidase-Test	25
M 4.5.	Cytochromreduktase-Test	26
M 4.6.	Succinatdehydrogenase-Test	26

M 5. Nitratreduktaseversuche 26
M 5.1. Aufarbeitung des Zellmaterials 26
M 5.2. Hungerbedingungen 27
M 5.3. Standardbelichtungsbedingungen 27
M 5.4. Enzymextraktion 28
M 5.5. Enzymaktivitätsmessungen 28
M 5.5.1. Gesamtaktivitätstest 28
M 5.5.2. Methylviologen-Aktivitätstest 29
M 5.6. Glucose-Test 29

ERGEBNISSE 30
E 1. Flavinversuche 30
E 1.1. Säulentrennsysteme 30
E 1.2. Hemmung des Abbaus von FAD im Zell-Lysat 36

E 2. Versuche zur Isolierung von Plasmamembran 43
E 2.1. Dichtegradienten 43
E 2.2. "Phase partition" im Tris-Citrat-Puffersystem 46
E 2.2.1. Variation der Polymerkonzentration 47
E 2.2.2. Variation der KCl-Konzentration 47
E 2.2.3. Gegenstromlauf 49
E 2.2.4. Variation der Salzspezies 50
E 2.2.5. Variation des pH 51
E 2.2.6. Variation der KCl-Konzentration bei pH 8,5 52
E 2.3. "Phase partition" im Phosphat-Puffersystem 54
E 2.3.1. Variation der Polymerkonzentration 54
E 2.3.2. Variation der KCl-Konzentration 55
E 2.3.3. Versuche in 16ml-Systemen 56
E 2.3.4. Maschineller Gegenstromlauf 60

E 3. Nitratreduktaseversuche 62
E 3.1. Einfluß der Sterilisationsbedingungen des Mediums auf die NR-Ausgangsaktivität 63
E 3.2. Glucoseverbrauch 64
E 3.3. Standardisierung des Inoculums 66
E 3.4. Enzymextraktion 67

E 3.5. Nitratreduktase-Aktivitätstests 70
E 3.6. Stabilität des Enzyms beim Einfrieren der Mycelprobe und im Rohextrakt 72
E 3.7. Belichtungsexperimente 73

DISKUSSION 81
D 1. Flavinversuche 81
D 2. Versuche zur Isolierung von Plasmamembran 85
D 3. Nitratreduktaseversuche 91

ZUSAMMENFASSUNG 99

LITERATURVERZEICHNIS 101

Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-äthyl-benzthiazolin-sulfonat (6)) Diammoniumsalz
BSA	Rinderserumalbumin
CCO	Cytochrom c Oxidase
Cyt	Cytochrom
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
DOCA	Natriumdesoxycholat
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure
FAD	Flavin adenindinucleotid
Fecy	Kaliumhexacyanoferrat (III)
FMN	Flavin mononucleotid
KPi	Kaliumphosphat-Puffer
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MVH	Reduziertes Methylviologen
NADPH	Reduziertes Nicotinamid adenindinucleotid-phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-hydroxypropansulfonsäure)
PM	Plasmamembran
PMS	Phenazinmethosulfat
Rf	Riboflavin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VM	Vogel's Minimalmedium

EINLEITUNG

Obwohl die Lichtsteuerung physiologischer Prozesse, z. B. der phototropen Krümmungsreaktion bei höheren Pflanzen und Pilzen, seit mehr als 100 Jahren systematisch untersucht wird (Darwin 1880; Blaauw 1909; Boysen-Jensen 1928; Sonne 1929), ist in vielen Fällen bis heute nicht eindeutig geklärt, welche Pigmente als Photorezeptoren dienen und welche Folgeprozesse durch die Absorption eines Lichtquantes an dem jeweiligen Rezeptormolekül hervorgerufen werden.

Bei Bakterien (Rilling 1964), Pilzen (Rau 1967; de Fabo et al. 1976), höheren Pflanzen (Curry und Thimann 1961) sowie Insekten (Klemm und Ninnemann 1976) wird eine Reihe von Prozessen durch blaues und ultraviolettes Licht gesteuert. In früheren Jahren wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Natur des "Blaulicht-Photorezeptors" (bzw. der möglicherweise vorhandenen verschiedenen Blaulicht-Rezeptorsysteme) durch Vergleich von Aktionsspektren lichtgesteuerter Prozesse mit den Absorptionsspektren einzelner Pigmente aufzuklären (Bachmann und Bergmann 1930; Johnson 1934; Bünning 1937; Galston und Baker 1949; Review siehe Ninnemann 1980). Die beiden hauptsächlich für das Rezeptorpigment diskutierten Substanzklassen sind Carotinoide und Flavine. Auf der Basis von Aktionsspektren allein läßt sich der Photorezeptor jedoch keiner dieser Klassen eindeutig zuordnen.

Ein anderer Weg wurde von Butler und Mitarbeitern beschritten (Poff et al. 1973; Poff und Butler 1974; Muñoz et al. 1974; Muñoz und Butler 1975): Von der Überlegung ausgehend, daß das Photorezeptorpigment seine Absorption bei der Lichtaufnahme ändern könnte, suchte die Arbeitsgruppe nach solchen lichtinduzierten Absorptionsänderungen in photosensitiven Organismen. In Pseudoplasmodien von Dictyostelium

discoideum sowie im Mycel von Phycomyces blakesleeanus und Neurospora crassa (Poff et al. 1973; Poff und Butler 1974; Muñoz et al. 1974) wurden nach Belichtung in vivo Absorptionsänderungen bei 420-430nm nachgewiesen, die durch die Photoreduktion eines Cytochroms vom b-Typ hervorgerufen wurden. Die Reduktion des Cytochroms erfolgte durch angeregtes Flavin, das Aktionsspektrum der Reaktion glich den Aktionsspektren verschiedener bis dahin bekannter blaulichtgesteuerter Prozesse (Muñoz und Butler 1975). Die Autoren stellten die Hypothese auf, daß ". . . Flavin das Photorezeptormolekül für alle diese lichtgesteuerten Reaktionen ist und ein lichtinduzierter Redoxübergang den primären Schritt beim Mechanismus der Photokontrolle darstellt."

Dieser ursprüngliche Anspruch kann wahrscheinlich nicht aufrechterhalten werden, da es möglicherweise keinen universellen Mechanismus der Signalumsetzung, sondern mehrere verschiedene Systeme gibt, die unter Umständen sogar in ein- und demselben Organismus nebeneinander existieren könnten. Nachfolgende Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, daß bei einem Teil der Blaulicht-gesteuerten Photoreaktionen (Reviews siehe Presti und Delbrück 1978; Gressel 1979; Ninnemann 1980) diese durch die Absorptionsänderung des Cytochroms leicht verfolgbare Reaktion einen bei der Umsetzung des Lichtsignals wichtigen Schritt darstellt (Brain et al. 1977a; Klemm und Ninnemann 1978).

Über Folgereaktionen, die durch die Reduktion dieses Cytochroms ausgelöst werden könnten bzw. darüber, welche Komponenten an diesem Prozeß in vivo beteiligt sind, gibt es lediglich Arbeitshypothesen. So ist zum Beispiel nicht geklärt, welches Flavin die im Mycel beobachtete Photoreduktion hervorruft: Es könnte freies Flavin sein, das mit dem Cytochrom b interagiert, oder beide Chromophore könnten fest an ein Protein gebunden sein. Ein solches "Photo-

rezeptor-Protein" könnte frei im Cytoplasma vorliegen oder, in eine Membran integriert, verschiedene dort ablaufende Prozesse steuern. Denkbar wäre z. B. eine Steuerung des Transportes einzelner Metabolite oder Ionen durch die Plasmamembran oder der Translation bestimmter Proteine an den Membranen des rauhen endoplasmatischen Reticulums. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Aktivität einzelner Enzyme durch unmittelbare Einwirkung des Lichts gesteuert wird.

Im ersten Teil der hier vorgelegten Arbeit wurde die Möglichkeit einer Beteiligung freier Flavine an der Photorezeption in Neurospora untersucht.

Um eine etwaige Korrelation zwischen einer Veränderung im Gehalt oder der Zusammensetzung der intrazellulären freien Flavine und verringerter Blaulichtsensitivität des Mycels nachweisen zu können, mußten diese Flavine aus den Zellen isoliert, angereichert und identifiziert werden. Die Untersuchungen wurden an der zellwandlosen Mutante "slime" durchgeführt, deren Zellen sich besonders leicht und schonend aufbrechen lassen. Es wurde eine Methode entwickelt, die die Untersuchung der freien Flavine unter geringstmöglicher artifizieller Freisetzung ursprünglich proteingebundener Flavine und ohne Beeinflussung durch FAD-abbauende Enzymaktivität(en) im Zell-Lysat erlaubt (Scheideler et al. 1984).

Die Membranversuche im zweiten Teil befassen sich mit der Lokalisation eines Cytochroms, das Bestandteil eines potentiellen Flavin/Cytochrom-Photorezeptorpaares sein könnte, in den Zellen von Neurospora.

Ein großer Teil der Untersuchungen über die von Butler und Mitarbeitern ursprünglich in Pilzmaterial entdeckte Photoreduktion eines b-Typ Cytochroms durch angeregtes Flavin wird heute wegen der einfacheren Handhabbarkeit der Systeme an höheren Pflanzen durchgeführt (s. u.). Ziel der Untersuchungen ist die Lokalisation und

Isolierung dieses Flavin/Cytochrom-Paares, d. h. eines potentiellen Flavohämoprotein-Photorezeptors. Dabei wird zum Teil mit Modellsystemen gearbeitet, die zwar keine bekannte Photoreaktion besitzen, dafür aber, wie z. B. Blumenkohl, einfach zu beschaffen und jederzeit in beliebiger Menge verfügbar sind. Die von Leong et al. (1981 a,b) und Widell et al. (1981; 1982; 1983 a,b) an Mais, Gerste, Hafer und Blumenkohl durchgeführten Membranisolierungen haben gezeigt, daß zumindest in diesen höheren Pflanzen ein photoreduzierbares b-Typ Cytochrom mit der Plasmamembran assoziiert vorliegt.

Die genannten Untersuchungen befassen sich in erster Linie mit der Entwicklung von geeigneten Methoden zur Charakterisierung dieses Flavin/Cytochrom-Redoxsystems und mit der Frage, ob die Absorptionsänderung des Cytochroms als "Marker" für die Plasmamembran höherer Pflanzen eingesetzt werden kann. Die Frage nach der physiologischen Signifikanz der in diesen Organismen beobachteten Photoreduktionen wird dabei als zweitrangig behandelt. Bei der Untersuchung von lichtinduzierten Absorptionsänderungen in der Plasmamembran photoinsensitiver Organismen wird davon ausgegangen, daß die beobachteten Absorptionswechsel auf dasselbe ehemals auch in diesem Organismus aktive Photorezeptorsystem zurückzuführen sind, die resultierende physiologische Reaktion jedoch im Laufe der Evolution verloren gegangen ist. Ein Beweis dafür, daß gerade die Photoreduktion eines solchen membrangebundenen b-Typ Cytochroms am Prozeß der Blaulicht-Photorezeption beteiligt ist, läßt sich jedoch nur mit einem Organismus erbringen, der tatsächlich lichtgesteuerte Reaktionen besitzt.

Ziel meiner Versuche war es, eine Möglichkeit zu finden, durch spektroskopische Untersuchungen der Plasmamembran einen Zusammenhang zwischen der Lichtsensitivität des Organismus einerseits und dem Auftreten dieses b-Typ Cytochroms bzw. seiner Photoreduzierbarkeit durch Blaulicht andererseits nachzuweisen. Der große Vorteil des

Neurospora-Systems liegt darin, daß vergleichende Untersuchungen sowohl am Mycel verschiedener Mutanten als auch mit ein- und demselben Stamm unter verschiedenen Anzuchtbedingungen durchgeführt werden können. Ich versuchte daher, die für die Isolation der Plasmamembran grüner Pflanzen entwickelten Methoden an die Bedürfnisse des Pilzsystems zu anzupassen.

Die Nitratreduktase-Versuche im dritten Teil beschäftigen sich mit einer weiteren oben bereits angeführten Möglichkeit, daß nämlich Licht durch unmittelbare Beeinflussung der Aktivität einzelner wichtiger Enzyme eines Stoffwechselweges tiefgreifende physiologische Veränderungen im Mycel hervorrufen kann.

Bei Neurospora scheint die Nitratreduktase, das erste Enzym der assimilatorischen Nitratreduktion, eine wichtige Rolle beim Prozeß der Conidienbildung zu spielen: Mycel, das auf Medium mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle angezogen wurde, bildet unter Substratmangelbedingungen nach wenigen Stunden Conidien aus. Auf gemischtem Ammonium-Nitrat-Medium angezogenes Mycel ist dagegen erst später oder überhaupt nicht zur Conidienbildung fähig (Klemm-Wolfgramm 1979). Im ersten Fall ist die Nitratreduktase des Mycels voll induziert, im zweiten dagegen weitgehend reprimiert.

Die Nitratreduktase von Neurospora enthält neben einem Molybdän-Cofaktor sowohl Flavin (FAD) als auch Cytochrom b als prostethische Gruppen (Garrett und Nason 1967). Belichtung des teilweise gereinigten Enzyms mit Blaulicht führt zu einer Photoreduktion dieses Cytochrom b_{557}. Die Reduktion kann sowohl über exogenes, d. h. zugegebenes Flavin, als auch über das "interne" FAD des Moleküls erfolgen (Ninnemann 1982). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dieser Photoreduktion, sichtbar durch die Absorptionsänderung des Cytochroms, und einer

lichtgesteuerten Reaktion in der Neurospora-Mutante al-2 bd: In dieser Albino-Mutante ist unter Hungerbedingungen eine Photostimulation der Conidienbildung möglich. Unter den Bedingungen, die für die Lichtstimulation der Conidienbildung notwendig sind, wird im intakten Mycel auch die lichtinduzierte Absorptionsänderung in vivo sichtbar (Klemm und Ninnemann 1978).

Unter Substratmangelbedingungen verlieren die Zellen einen Teil ihrer Nitratreduktaseaktivität. Die Stimulation der Conidienbildung könnte durch eine Wiederherstellung dieser Enzymaktivität ausgelöst werden, zumal Versuche von Roldan und Butler (1980) und Fritz und Ninnemann (1985) gezeigt hatten, daß isolierte Nitratreduktase von Neurospora zumindest in vitro durch Blaulicht reaktivierbar ist. Ziel meiner Versuche war die Untersuchung einer möglichen Photoreaktivierung des inaktivierten Enzyms in vivo.

MATERIAL UND METHODEN

M 1. Anzucht des Zellmaterials

M 1.1. Neurospora crassa "slime"

Die Anzucht der zellwandlosen Mutante "slime" (FGSC 1118) erfolgte in Vogel's Minimalmedium (Vogel 1956) mit 2% Saccharose und 10% Sorbit als Osmotikum. Auf einer Rotationsschüttelmaschine wurden 50ml-Kulturen in 250ml-Erlenmeyerkolben mit 80Upm bei 30°C im Dunkeln kultiviert.

M 1.2. Neurospora crassa al-2 bd

Die rhythmische Albinomutante al-2 bd stammt aus dem Labor von Prof. S. Brody, University of California San Diego at La Jolla, Ca., USA. Die Mutante wurde auf Vogel's Minimalmedium mit 2% Saccharose als C-Quelle kultiviert. Zwei 2l-Erlenmeyerkolben mit je 300ml Medium wurden mit je 1-2ml einer sterilen Conidiensuspension (0,5-2 x 10^8 Conidien/ml) beimpft und für 18-20h auf einer Bühler-Schüttelmaschine mit 150Upm bei 30°C im Dunkeln angezogen. Die Vorkulturen wurden in eine 10l-Glasflasche mit 8l Medium überführt und das Mycel unter steriler Preßluft-begasung für weitere 16-20h kultiviert.

Um Material mit voll induzierter Nitratreduktase zu erhalten, wurden für die Nitratreduktase-Versuche die Anzuchtbedingungen modifiziert: 50mM $NaNO_3$ anstelle von 25mM NH_4NO_3 als N-Quelle und 1% Glucose anstelle von 2% Saccharose als C-Quelle. Anzucht in Schüttelkulturen bei 80Upm und 30°C für 18h.

M 2. Proteinbestimmungen

M 2.1. Modifizierte Lowry-Methode

Die Proteinprobe wurde mit 50µl DOCA (10% Na-Desoxycholat in H_2O) versetzt und mit aqua dest. auf 200µl aufgefüllt. Durch Zugabe von 3,6ml Reagenz C (s. u.) wurde die Reaktion gestartet. Nach 10min wurden 400µl Reagenz D zugegeben und nach weiteren 30min die Extinktion bei 660nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. BSA diente als Standard. (Modifiziert nach Lowry et al. 1951.)

Der Proteingehalt der Proben wurde bei den Flavinversuchen (E 1.) und den Nitratreduktaseversuchen (E 3.) nach dieser Methode bestimmt.

Reagenz A : 20g Na_2CO_3 plus 4g NaOH, auf 1l mit aqua dest.
B_1: 1% $CuSO_4$
B_2: 2% Na-K-Tartrat
C : 1ml B_1 plus 1ml B_2, auf 100ml aufgefüllt mit Reagenz A
D : 8ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz plus 5ml aqua dest.

M 2.2. Proteinbestimmungen mit Coomassie Brilliant Blue

Bradford-Methode: Die Proteinprobe wurde mit aqua dest. auf 100µl aufgefüllt und mit 3.5ml Reagenz (s.u.) gemischt. Nach 10min wurde die Extinktion bei 595nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. BSA diente als Standard.
Reagenz: 40mg Serva Blau G in 50ml 95% Äthanol lösen, mit 100ml 85% w/v Phosphorsäure versetzen und mit aqua dest. auf 1l auffüllen (Bradford 1976).

Der Proteingehalt der Proben wurde bei den Membranversuchen mit Dichtegradienten (E 2.1.) und bei den "Partition"-Versuchen im Tris-Citrat-Puffersystem (E 2.2.) nach dieser Methode bestimmt.

Bearden-Methode: Bei dieser Modifikation der ursprünglichen Bradford-Methode wird die Empfindlichkeit des Tests dadurch gesteigert, daß in einer Differenzmessung die Extinktion des Protein-Farbstoffkomplexes bei 595nm (s. o.) gegen die Extinktion des nicht an Protein gebundenen Farbstoffes bei 465nm gemessen wird (Bearden 1978). Die Messungen wurden in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Aminco DW-2) im Differenz-Modus durchgeführt. BSA diente als Standard.

Der Proteingehalt der Proben wurde bei den "Partition"-Versuchen im Phosphat-Puffersystem (E 2.3.) nach dieser Methode bestimmt.

M 3. Flavine

M 3.1. Aufarbeitung des Zellmaterials

Neurospora crassa "slime" wurde durch eine 10minütige Zentrifugation bei 190g geerntet. Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4°C. Die Lyse erfolgte durch osmotischen Schock in aqua dest. bzw. Puffer wie angegeben. Durch eine 20minütige Zentrifugation bei 50 000g (Sorvall SS-34) wurden die Zelltrümmer sedimentiert. Der Überstand wurde in den Säulenläufen eingesetzt.

M 3.2 Anreicherung der Flavine durch Phenolextraktion

20ml Probe wurden mit Ammonsulfat gesättigt und 20min bei 27 000g (Sorvall SS-34) zentrifugiert. 25ml des Überstandes wurden mit 1,3ml gesättigter Phenollösung versetzt und ausgeschüttelt. Die Emulsion wurde in einen 25ml-Meßkolben überführt und die Phasen durch eine kurze Zentrifugation des Meßkolbens in einer Tischzentrifuge (1500Upm, 5min) getrennt. Die obere Phenolphase wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Extraktion mit 1,2ml Phenol wiederholt. Die vereinigten Phenolphasen wurden im zweiten Konzentrierungsschritt durch Zugabe von 12,5ml Diäthyläther unpolar gemacht und siebenmal mit aqua dest. extrahiert (1. Extraktion 400µl, alle folgenden 100µl; Scheideler 1980).

M 3.3. Dünnschichtchromatographie

Die wässrigen Phasen wurden als Bande auf eine Dünnschichtplatte (Merck Kieselgel H, Typ 60, Schichtdicke 0,5mm) aufgetragen und mit Warmluft getrocknet. Als Referenzsubstanzen dienten kommerzielle Präparationen von Riboflavin, FMN und FAD. Die Dünnschichtplatte wurde in 2,4g Na_2HPO_4 x $2H_2O$ / 100ml aqua dest. im Dunkeln entwickelt. Nach dem Trocknen wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und markiert.

M 3.4. Quantitative Bestimmung

Die einzelnen Banden wurden ausgekratzt und in jeweils 4ml 0,5N NaOH aufgenommen. Nach 30min alkalischer Photolyse vor 6 Leuchtstoffröhren (Osram L 20 W/30) wurden 400µl Eisessig zugegeben. Das gebildete Lumiflavin wurde in 4ml Chloroform überführt und im Fluoreszenzspektralphotometer vermessen (Anregung bei 466nm, Messung der Flavinemission bei 525nm, nach Yagi 1962).

M 4. Versuche zur Isolierung von Plasmamembran

M 4.1. Aufarbeitung des Zellmaterials

M 4.1.1. Material für Versuche mit Dichtegradienten

Das Medium wurde über ein Nylontuch von 36µm Porengröße abfiltriert und das Mycel mit aqua dest. gründlich gespült. Überschüssiges Wasser wurde ausgedrückt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte in einer Glasperlenmühle (Küvetteninhalt 300ml, mit 240ml Mahlperlen 0,4mm gefüllt) in MOPS-Puffer (0,1M MOPS; 14mM Mercaptoäthanol; 3mM EDTA; 0,1mM $MgCL_2$; mit KOH auf pH 7,4 eingestellt), es wurde 3 x 30sec homogenisiert. Die Perlen waren auf 4°C vorgekühlt, der Puffer stand auf Eis, der Kühlmantel der Küvette war mit Eiswasser gefüllt. Der Küvetteninhalt wurde durch das 36µm-Nylontuch filtriert und das Filtrat anschließend in der Sorvall-Kühlzentrifuge bei 4°C differenziell zentrifugiert: 10min 2 000g; Überstand davon 20min 10 000g. 24ml-Aliquots dieses Überstandes wurden mit 8ml eines MOPS-Puffers mit 32% Saccharose unterschichtet und 90min bei 100 000g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde durch wiederholtes Aufziehen mit einer Injektionsspritze in MOPS-Puffer mit 10% Saccharose aufgenommen.

M 4.1.2. Material für "Partition"-Versuche im Tris-Citrat-Puffersystem

Das al-2 bd Mycel wurde wie unter M 4.1.1. in der Glasperlenmühle aufgeschlossen. Die Methode war wie folgt modifiziert: Homogenisationspuffer 250mM Saccharose; 50mM TRIS; mit Citrat auf pH 7,5 eingestellt. Homogenisationsdauer 45sec. Differentielle Zentrifugation bei 4°C und 2 000g 10min; 10 000g 20min; 50 000g 1h. Der 50 000g-Niederschlag

wurde in 4-10ml 5mM Tris-Citrat pH 7,5 mit 250mM Saccharose aufgenommen und portionsweise eingefroren.

M 4.1.3. Material für "Partition"-Versuche im Phosphat-Puffersystem

Das Mycel (al-2 bd) wurde in einem modifizierten Braun-Mixer (Messerkopf enthielt 4 auswechselbare Rasierklingen an Stelle des serienmäßigen oberen Messers) in 150ml Homogenisierungspuffer (325mM Saccharose; 25mM MOPS; 3mM EDTA; 0,1mM $MgCL_2$; 8mM Cystein; auf pH 7,8 eingestellt mit NaOH; Widell und Larsson 1981) 20 x 5sec mit der höchsten Intensitätsstufe (3) im Kühlraum homogenisiert und anschließend bei $4^{o}C$ differenziell zentrifugiert: 2 000g 10min; Überstand davon 10 000g 20min; Überstand 50 000g 1h. Der 50 000g-Niederschlag wurde in 5mM Kaliumphosphatpuffer (KPi) pH 7,8 mit 250mM Saccharose aufgenommen und in den "Partition"-Versuchen eingesetzt.

M 4.2. Versuchsdurchführung

M 4.2.1. Dichtegradienten

Kontinuierliche Dichtegradienten wurden mit einem 2-Kammer-Gradientenmischer hergestellt. Der Inhalt der vorderen Kammer wurde mit einem schraubenförmigen Rührer von oben gerührt. Die Ausgangslösungen für Renografin-Gradienten (Amerikanischer Markennahme, ein adäquates Produkt ist in Deutschland unter dem Namen Urografin erhältlich; Röntgen-kontrastmittel) der entsprechenden % (v/v)-Konzentrationen wurden durch Vermischen des kommerziellen Urografin-Präparates mit MOPS-Puffer (ohne Saccharose und Mercaptoäthanol) hergestellt.

M 4.2.2. "Phase partition" im Tris-Citrat-Puffersystem

Aus den beiden Polymeren Dextran T 500 (Pharmacia) und PEG 4000 (Serva) und dem Phasenpuffer (5mM Tris-Citrat pH 7,5 mit 250mM Saccharose) wurde eine Phasensystem-Stammlösung ("Phasenmix") angesetzt, die beide Polymere 8%ig (w/w) enthielt. Die jeweiligen Phasensysteme wurden auf der Waage aus den einzelnen Komponenten zusammengestellt. Der Phasenmix wurde dabei ständig auf einem Magnetrührer durchmischt.

Beispiel für ein 5g-System mit 4,8% Polymer und 1,5mM KCl: 3g Phasenmix vorlegen, 7,5µl 1M KCl zugeben (Hamiltonspritze), mit Puffer auf 4,5g auffüllen. Nach Äquilibrierung der Temperatur wurden die vorbereiteten Phasensysteme im Kühlraum mit jeweils 500mg Probe versetzt (Verstellbare Druckpipette mit Puffer auf 500mg Ausstoß eingewogen), 25mal von Hand gewendet und die Phasen durch eine kurze Zentrifugation in der Tischzentrifuge getrennt. Mit Pasteurpipetten wurden zunächst die Oberphasen in frische Gläser überführt, dann wurde die Phasengrenze durchstochen und die Unterphase abgesaugt. Ober-, Mittel-, und Unterphase wurden mit Phasenpuffer verdünnt, 60min. bei 50 000g zentrifugiert und das Membranmaterial durch mehrmaliges Auf- und Absaugen mit einer Injektionsspritze in 0,5 bis 1ml Puffer aufgenommen.

pH-Reihen: Für diese Versuche wurde ein Phasenmix ohne Puffer, aber mit Saccharose angesetzt. Durch Vermischen von Tris-Lösung (100mM Tris, 250mM Saccharose) und Citrat-Lösung (100mM Citrat, 250mM Saccharose) wurden Puffer zwischen pH 7 und 9 hergestellt. Die Phasensysteme wurden wie vor aus Phasenmix, KCl, den verschiedenen Puffern und der Probe eingewogen. Da sich das pH bei Zugabe der in 5mM Tris-Citrat pH 7,5 gelösten Proben verschob, wurden die

tatsächlichen pH's nach dem Vermischen der Systeme mit den Proben im Kühlraum mit einer kalt geeichten Elektrode ermittelt.

M 4.2.3. "Phase partition" im Phosphat-Puffersystem

Es wurden Stammlösungen von Dextran, PEG, Phosphatpuffer, Saccharose und KCl hergestellt.
Aus den Stammlösungen der einzelnen Komponenten wurden 4- bzw. 16ml-Systeme hergestellt. Beispiel für ein 4ml-System mit einer Polymerkonzentration von 6,3% w/w, ohne Salz:

Dextran	20% w/w	1,260 g
PEG	40% w/w	0,630 g
Saccharose	2M	0,525 g
KPi pH 7,	0,1M	0,176 g
H_2O		0,909 g
		3,500 g
Probe		0,500 g
		4,000 g

Nach Äquilibrierung der Temperatur wurden die Proben im Kühlraum auf der Waage zu den vorbereiteten Phasensystemen pipettiert und die Systeme durch 20-30maliges Umdrehen des Glases durchmischt. Die Phasen wurden durch 5minütige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Sorvall MSE 1000Upm) getrennt und die Oberphasen mit Pasteurpipetten abgesaugt. Die Phasengrenze wurde zusammen mit der Unterphase aufgearbeitet.
Bei der zweistufigen Methode wurden Ober- und Unterphase wieder mit frischer Gegenphase versetzt und der Verteilungsschritt wurde wiederholt. Daraus resultieren nach dem zweiten Verteilungsschritt vier Phasen: Die gewaschenen Ober- und Unterphasen O_2 und U_2 und die jeweiligen Waschphasen UO_2 und OU_2 (Fig. 1).

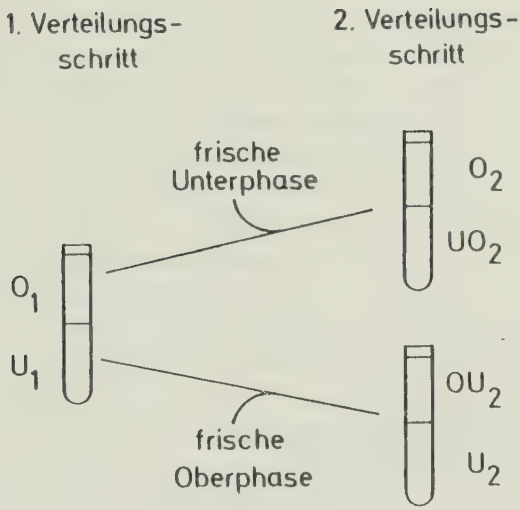

Fig. 1: Schematische Darstellung der zweistufigen "Phase partition"-Methode mit 16ml-Systemen.

Alle Phasen wurden mit 5mM Tris-Citrat-Puffer pH 7,5 und 250mM Saccharose verdünnt und 45min bis 2h bei $4^{o}C$ und 100 000 - 200 000g zentrifugiert. Die Niederschläge wurden, wie vorher beschrieben, aufgenommen und untersucht.
Ein zusätzliches Phasensystem diente als Kontrolle für unspezifische Effekte, d.h. Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch das Phasenmaterial oder den Verdünnungs- und Resuspendierungsschritt. Die Phasen des Kontrollsystems wurden bereits vor der Probenzugabe getrennt, dann mit einem Aliquot (200-300µl) der jeweiligen Probe versetzt und anschließend wie die anderen Phasen verdünnt, zentrifugiert und resuspendiert.

M 4.2.4. Maschineller Gegenstromlauf

Die ersten sechs Kammern einer 60-Kammer-Gegenstromapparatur nach Albertsson (1971) wurden mittels einer Injektionsspritze mit je 1,42ml des kompletten, bereits die Probe enthaltenden Systems (5,9% Polymer, kein KCl) gefüllt, in die restlichen Kammern wurden je 0,71ml Ober- und Unterphase gegeben. Die Gegenstromverteilung lief über Nacht bei 4°C, jeweils 4 Fraktionen wurden vereinigt und aufgearbeitet wie unter M 4.2.3. beschrieben.

M 4.3. Plasmamembran-ATPase-Test

Der Verbrauch von ATP wurde über die Freisetzung von anorganischem Phosphat gemessen. Der Testmix für Plasmamembran ATPase enthielt: 5mM Na_2ATP (Böhringer); 5mM $MgCl_2$; 5mM PEP; 5µl/ml Pyruvat Kinase (Sigma P-1506); 0,5mM EDTA und 5mM KN_3 in 100mM Tris-PIPES pH 6,7 (modifiziert nach Bowman et al. 1978). 500µl Testmix und 50µl Enzym wurden für 5-60min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100µl 50%iger TCA gestoppt, die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt, und im Überstand das freigesetzte Phosphat gemessen.

Phosphatmessung: Vom Überstand der ATPase-Tests wurden je 200µl mit 1,6ml aqua dest. und 200µl Molybdat-Vanadat-Reagenz (s.u.) versetzt. Die Konzentration des Phospho-Molybdat-Komplexes wurde spektralphotometrisch bei 350nm bestimmt. Als Leerwert dienten ATPase-Testansätze, die an Stelle von Enzym die entsprechende Menge Wasser enthielten und zur gleichen Zeit mit TCA versetzt worden waren. Es wurde so schnell wie möglich gearbeitet, um die säurekatalysierte Freisetzung von anorganischem Phosphat aus ATP möglichst gering zu halten.

Molybdat-Vanadat-Reagenz: 40ml aqua dest. wurden mit 12,5ml 98%iger Schwefelsäure versetzt und auf Eis gekühlt. 2.5g Ammoniummolybdat und 0,1g Ammoniumvanadat wurden unter Erhitzen auf 40-60°C in 40ml aqua dest. gelöst, gekühlt und mit der Schwefelsäurelösung versetzt. Das Reagenz wurde mit aqua dest. auf 100ml aufgefüllt und dunkel gelagert.

M 4.4. Cytochromoxidase-Test

Die Oxidation von Cytochrom c durch das Enzym wurde durch Abnahme der Extinktion bei 550 nm im Zweistrahlspektrophotometer (Perkin-Elmer 356 bzw. Aminco DW-2) verfolgt. Ein Meßansatz enthielt 10µl einer Lösung von reduziertem Cytochrom c und 4-100µl Enzym, mit 100mM KPi pH 7.2 aufgefüllt auf 1ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet. Als Referenz diente oxidiertes Cytochrom c (10µl Lsg., auf 1ml mit Puffer aufgefüllt). Herstellung der Cytochrom c-Lösungen: 12,5mg oxidiertes Cytochrom c (Sigma C-2506) wurden in 1ml 100mM KPi pH 7.2 gelöst. Ein Teil der Lösung wurde durch Zugabe einiger Na-Dithionit-Körner reduziert und das überschüssige Dithionit durch eingeleitete Preßluft ausgetrieben.
Während der späteren Phasentrennungsversuche (E 2.3) wurde die Methode leicht modifiziert: Die Messungen wurden in 10mM KPi pH 7.8 durchgeführt. Zur Herstellung der Cytochrom c-Lösungen wurden 12.5 mg Cytochrom c_{ox} pro ml 100mM KPi pH 7.8 eingewogen. Die Lösung wurde geteilt. Ein Teil wurde durch Zugabe von Na-Dithionit reduziert, der andere blieb oxidiert. Je 10µl von beiden Lösungen wurden mit 10mM KPi pH 7.8 auf 1ml aufgefüllt, anschließend wurde E_{550} red-ox gemessen. Die voll reduzierte Lösung wurde mit der oxidierten titriert, bis noch ca. 85% des Cytochrom c reduziert vorlagen. Diese Lösung wurde in den Messungen (10µl pro 1ml Meßansatz) eingesetzt.

M 4.5. Cytochromreduktase-Test

NADH-abhängige Cytochromreduktase-Aktivität wurde durch Zunahme der Extinktion von reduziertem Cytochrom c bei 550nm gemessen. Ein Meßansatz enthielt 10µl Cytochrom c-Lösung (12,5mg Cytochrom c_{ox} pro ml 100mM KPi pH 7,2) und 4-100µl Enzym, mit Puffer (100mM KPi pH 7,2; 1mM KCN) aufgefüllt auf 980µl. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20µl NADH 50mM gestartet.

M 4.6. Succinatdehydrogenase-Test

Die Oxidation von Succinat wurde mit DCPIP als künstlichem Elektronenakzeptor durch Abnahme der Extinktion bei 600nm gemessen. Der Testmix enthielt: 3mM EDTA; 3mM KCN und 50µM DCPIP in 0,1M NaPi pH 7,6. Je 50µl Enzym wurden mit 1ml Testmix für 20-40min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10µl 0,9M Na-Succinat gestartet. Für jede Probe wurde ein eigener Leerwert mit 10µl aqua dest. an Stelle von Succinat erstellt.

M 5. Nitratreduktaseversuche

M 5.1. Aufarbeitung des Zellmaterials

Zwei 300ml-Schüttelkulturen wurden vereinigt, gut durchmischt und auf zwei Standzylinder verteilt. Der Inhalt der beiden Standzylinder wurde in einem Membranfiltrationsgerät (Schleicher und Schüll) mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe auf je ein Membranfilter (Sartorius Typ SM 11 303, Porengröße 8µm) gesaugt und dreimal mit aqua dest. gespült. Die Mycelmatten wurden von den Filtern abgezogen und mit der

Schere in Achtelsegmente zerteilt. Die so erhaltenen 16 Mycelstücke wurden in den Belichtungsexperimenten eingesetzt.

M 5.2. Hungerbedingungen

Als Kontrolle für die Nitratreduktase-Ausgangsaktivität des Mycels wurde eine Mycelprobe unmittelbar nach der Ernte in Aluminiumfolie eingeschlagen und bei -196°C eingefroren. Die restlichen Proben wurden im Dunkeln bei 30°C und 100% Luftfeuchtigkeit ausgehungert. Dazu wurden die 15 Mycelstücke auf zwei Plastikpetrischalen ohne Deckel verteilt. Diese Schalen standen in einer verschlossenen großen Glaspetrischale, deren Boden mit Wasser bedeckt war.

M 5.3. Standardbelichtungsbedingungen

Zu verschiedenen Zeiten nach der Ernte (2-24h) wurden Mycelstücke unter rotem Sicherheitslicht (Kindermann Fotolabor) entnommen. Die Dunkelkontrollen wurden sofort in Aluminiumfolie verpackt. Die Belichtung der Proben erfolgte in einer Plastikpetrischale mit Deckel, deren eine Hälfte mit feuchtem Filterpapier ausgelegt war. Die Belichtungszeit betrug 20 Minuten, anschließend wurde die Probe ebenfalls in Aluminiumfolie verpackt und zusammen mit der Dunkelkontrolle in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Als Lichtquelle diente eine 300 Watt-Reflektorglühbirne (Osram Argenta, 300W, 35°), gefiltert durch eine 1,5cm dicke Schicht von 15%iger Kupfersulfatlösung. Die auf die Probe treffende Lichtenergie wurde mit einem YSI-Radiometer (Yellow Springs Instruments) bestimmt und betrug $28 W/m^2$ (Abstand Lampe-Filter 14cm; Filter-Probe 10cm).

M 5.4. Enzymextraktion

Die Mycelproben wurden aufgetaut und in 10ml eiskaltem 100mM KPi pH 7,2 suspendiert und in einem Eiswasserbad mit Ultraschall behandelt (4mal 15sec. mit jeweils 15sec. Pause zwischen den einzelnen Behandlungen, Branson Sonifier Modell B 12, Mikrorüssel, Intens. 7, Probe in einem dreiarmigen Spezialbeschallungsgefäß für optimale Wärmeenergieableitung). Das Homogenat wurde 20min. bei 4°C und 20 000g zentrifugiert (Sorvall SS-34 Rotor) und die Enzymaktivität im Überstand bestimmt.

M 5.5. Enzymaktivitätsmessungen

Die Messung der verschiedenen Nitratreduktaseaktivitäten (Gesamtaktivität: NADPH-NO_3^-; terminale Aktivität MVH-NO_3^-; Garrett und Nason 1969) erfolgte über die colorimetrische Bestimmung des gebildeten Nitrits (Nicholas und Nason 1957). Die Enzymaktivität wird in Units (nmol Nitrit gebildet / 10min bei 30°C) angegeben.

M 5.5.1. Gesamtaktivitätstest

Der Testansatz für Gesamtaktivität enthielt in 410µl: 100µl 0,1M KNO_3; 50µl FAD 0,1mM; 20µl KCN 1mM; 240µl 0,1M KPi pH 7,2 und 5-200µl Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40µl NADPH 2mM gestartet und nach 5-30min. durch Zugabe von 50µl Stopmix (1,5mM PMS; 4mM Fecy; Scheideler und Ninnemann 1986) beendet.

M 5.5.2 Methylviologen-Aktivitätstest

Der Testansatz für terminale Aktivität enthielt in 400µl: 100µl KNO_3 0,1M; 100µl Methylviologen 10mM; 200µl 0,1M KPi, pH 7,2 und 50-100µl Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50µl Dithionitlösung (Na-dithionit 8mg/ml in 0,8% Na_2CO_3) gestartet und durch Oxidation des Dithionits auf einem Vortex-Mixer beendet.
Alle Enzymtests wurden in einem Wasserbad bei 30°C durchgeführt.

Nach Beendigung der Enzymtests wurde das gebildete Nitrit durch Zugabe von 1ml Nachweisreagenz (1:1 Gemisch aus 1% Sulfanilamid in 2,5% HCl und 0,1% N-(1-Naphthyl)-äthylen-diammonium-dichlorid in Wasser; Scheideler und Ninnemann 1985) in einen roten Azofarbkomplex überführt und durch spektralphotometrische Messung bei 540nm bestimmt.

M 5.6. Glucose-Test

Die Abnahme der Glucosekonzentration des Anzuchtmediums (1 bzw. 2% Glucose) wurde mit Hilfe der Glucoseoxidase-Reaktion gemessen (Werner et al. 1970). Der frisch zubereitete Testmix enthielt 0,1µl Peroxidase (2500 Units/ml; Böhringer); 0,1mg Glucoseoxidase (100 Units/mg; Böhringer) und 0,5mg ABTS (Böhringer) pro ml 0,1M KPi pH 7,0.

Jeweils 80µl Kulturmedium wurden mit aqua dest. auf 5ml (Medium mit 1% Glucose) bzw. 10ml (Medium mit 2% Glucose) aufgefüllt. Je 0,5ml dieser verdünnten Lösungen wurden mit 2,5ml Testmix für 15min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Proben bei 610nm im Spektralphotometer bestimmt.

ERGEBNISSE

E 1. Flavinversuche

Die von Muñoz und Butler im Mycel von Neurospora in vivo beobachtete Photoreduktion eines b-typ Cytochroms könnte möglicherweise von freiem, durch Blaulicht angeregtem Flavin hervorgerufen werden. Es sollte eine Methode entwickelt werden, die eine Untersuchung und Identifizierung der intrazellulären freien Flavine erlaubte. Um eine artifizielle Freisetzung ursprünglich proteingebundener Flavine während der Aufarbeitung zu vermeiden, wurde mit der zellwandlosen Mutante "slime" gearbeitet, deren Zellen leicht und schonend durch osmotischen Schock lysiert werden können.

E 1.1. Säulentrennsysteme

Die Flavine der Zellen mußten zur Identifizierung mit dem unter M 3.3. beschriebenen dünnschichtchromatographischen System (Scheideler 1980) zunächst angereichert werden.

Der Phenolanreicherungsschritt (M 3.2.) beinhaltete eine Proteinfällung mit Ammonsulfat. Es bestand die Gefahr, durch die dabei auftretende Konformationsänderung der Proteine gebundene Flavine freizusetzen. Um die Anteile von Riboflavin (Rf), FMN und FAD am freien Flavin der Zellen ohne Beeinträchtigung durch diese ursprünglich gebundenen Flavine untersuchen zu können, mußten die freien Flavine von den (Flavo-) Proteinen getrennt werden.

Ich versuchte zunächst, mit einer für Flavine spezifischen Affinitätssäule zu arbeiten. Aus Resorcin und Formaldehyd wurde ein bakelitähnlicher Kunststoff hergestellt, der während des Polymerisationsprozesses durch ein engmaschiges Sieb gedrückt wurde und so zu einheitlich kleinen Partikeln polymerisierte (Koziolowa und Koziol 1968). Das so entstandene Säulenmaterial wurde in eine 0,8 x 10cm Glassäule gefüllt.

Die Versuche mit Gemischen aus käuflichen Flavinen und BSA zeigten, daß die Flavine zwar selektiv auf der Säule gebunden wurden, von dort aber nur mit einem großen Volumen an Waschpuffer wieder eluiert werden konnten. Ferner verlor das Säulenmaterial, vermutlich auf Grund von Verunreinigung durch Protein, rasch an Affinität und mußte daher nach wenigen Trennungsgängen gewechselt werden. Diese Schwierigkeiten traten bei einer Trennung der löslichen Zellbestandteile nach Molekülgröße mit Hilfe der Gelfiltrationstechnik nicht in dem Maße auf.

In Versuchen mit verschiedenen Gelbettdimensionen und Säulenmaterialien wurde die beste Trennung auf einer 90cm langen Säule mit Sephadex G-50 medium erzielt. Fig. 2 zeigt ein typisches Elutionsdiagramm. Gemessen wurden die Flavinfluoreszenz bei 525nm, die Proteinabsorption bei 280nm und der Proteingehalt nach der Lowry-Methode. Die in den Fraktionen 21-29 gemessene Fluoreszenz korrelierte mit dem Proteinmaximum sowie dem höchsten UV-Absorptionsmaximum. Das UV-Maximum in den Fraktionen 48-60 ist wahrscheinlich auf kleinere Peptide zurückzuführen, während die UV-Absorption der Fraktionen 64-72 offenbar von anderen Komponenten hervorgerufen wird, da mit der Lowry-Methode kein Protein nachgewiesen werden konnte. Die freien Flavine (Fraktionen 56-72) wurden eindeutig von der Masse der Zellproteine und den proteingebundenen Flavinen getrennt.

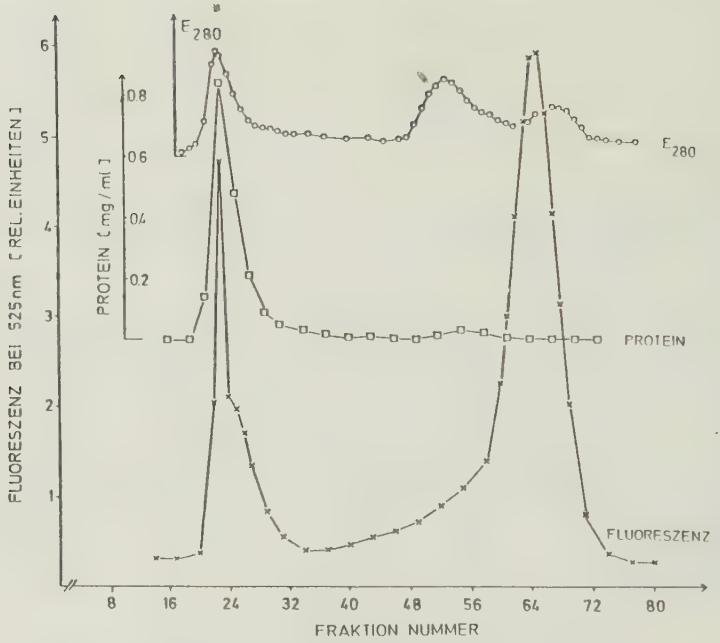

Fig. 2: Trennung von freien Flavinen und Protein mit Sephadex G-50. Die Zellen von zwei Tage alten Kulturen der Neurospora-Mutante "slime" wurden geerntet, durch osmotischen Schock in 4ml eiskaltem dest. Wasser lysiert und 2h bei 100 000g zentrifugiert. 2ml des Überstandes wurden zur Trennung von freien und proteingebundenen Flavinen auf der Sephadex G-50-Säule (1,55 x 90cm) eingesetzt. Die Trennung auf der Säule lief über Nacht in 50mM KPi pH 7,0. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1,8ml gesammelt.

Die freie Flavine enthaltenden Fraktionen bzw. die Fraktionen des Proteinmaximums wurden jeweils vereinigt und getrennt untersucht. In den ersten Versuchen fand ich einen unerwartet niedrigen FAD-Anteil gegenüber großen Mengen an FMN in beiden Pools. Da fast alle Flavoenzyme FAD als prostethische Gruppe tragen, schien dieser Befund auf einen Abbau von FAD im Zell-Lysat hinzudeuten. Ich überprüfte diese Möglichkeit durch Zugabe von chromatographisch gereinigten Flavinstandards zu groben Zell-Lysaten bzw. Zentri-

fugations-Überständen und fand in der Tat einen raschen Umbau von zugegebenen FAD-Standards zu FMN bzw. Rf (Tab. 1). Aus dem Flavingehalt der Nullkontrolle (Zell-Lysat, kein FAD zugegeben) und der FAD-Menge im zugegebenen Standard ließ sich die Flavinverteilung der Proben für den Fall, daß kein Umbau stattfände, berechnen. Sie lag bei 89% FAD, 7% FMN und 4% Rf. Nach ca. 5sec bei Raumtemperatur war der FAD-Anteil am Gesamtflavin bereits auf 63% gefallen, nach 10min im Kühlraum bei 5°C betrug er noch 28%, und nach Sephadex-Filtration über Nacht wurden nur 25% FAD, dagegen aber 70% FMN und 5% Riboflavin gefunden.

Probe	Behandlung	nmol			%		
		Rf	FMN	FAD	Rf	FMN	FAD
(1) Nullkon.		0,8	1,7	1,0	23	48	29
(2) FAD-Sta.		0,8	1,5	39,0	2	4	94
errechnete Verteilung (1+2)		1,6	3,2	40,0	4	7	89
(1) plus (2)	5sec bei RT	4,1	11,7	27,1	10	27	63
(1) plus (2)	10min bei 5°C	7,9	26,1	13,3	17	55	28
(1) plus (2)	G-50 bei 5°C über Nacht	1,9	26,6	9,3	5	70	25

Tab. 1: 5 Tage alte Kulturen (200ml) wurden geerntet, durch Aufnehmen in 8ml aqua dest. und vorsichtiges Pottern von Hand lysiert und 20min bei 4°C und 50 000g zentrifugiert. Je 2ml des Überstandes wurden mit FAD-Standard versetzt und den in der Tabelle beschriebenen Bedingungen unterworfen. Die Abbaureaktion wurde durch Auffüllen der Proben mit 80°C heißem aqua dest. auf 20ml gestoppt und die Flavine wurden extrahiert. Die endogenen Flavine wurden ohne vorherige Zugabe von FAD (Nullkontrolle) mit 18ml Dest. aus 2ml des Überstandes extrahiert (1). Der FAD-Standard wurde ebenfalls mit heißem aqua dest. auf 20ml aufgefüllt und der gesamten Extraktionsprozedur unterworfen (2).
RT = Raumtemperatur; G-50 = Sephadex G-50 Säule

Durch Erhitzen des Lysats für 15min auf 75°C in einem Wasserbad ließ sich der Abbau von FAD verhindern (Scheideler et al. 1984). Es handelte sich offensichtlich um eine enzymkatalysierte Reaktion. Zur Bestimmung der Zusammensetzung der freien Flavine war eine Methode der Extraktion in heißem Wasser jedoch nicht einsetzbar, da ein Teil der vorher enzymgebundenen Flavine bei der Denaturierung der Proteine freigesetzt werden kann. Ich untersuchte daher, ob sich 1) die freien Flavine von dieser(n) FAD-abbauenden Enzymaktivität(en) durch die Sephadex-Säule trennen ließen, versuchte 2) die Abbaureaktion spezifisch zu hemmen und 3) die Aufarbeitung soweit wie möglich zu beschleunigen.

Zunächst wurde der FAD-Abbau in verschiedenen Säulenfraktionen untersucht. Sowohl die Protein enthaltenden als auch die freies Flavin enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und für 10min im Kühlraum mit einem FAD-Standard inkubiert. Die anschließende Extraktion der Flavine zeigte, daß in den gepoolten Fraktionen des Proteinmaximums annähernd das gesamte zugegebene FAD innerhalb von 10min zu FMN umgewandelt abgebaut worden war, während es aus den die freien Flavine enthaltenden Fraktionen unverändert extrahiert wurde (Fig. 3).

Offenbar waren die Proteine, die die FAD-abbauende Aktivität tragen, groß genug, um unter diesen Gelfiltrationsbedingungen von den freien Flavinen vollständig getrennt zu werden. Ich versuchte daher, ein Puffersystem zu entwickeln, mit dem der Abbau von freiem FAD während der Lyse und der ersten Schritte der Aufarbeitung bis zu dem Zeitpunkt, an dem die freien Flavine von der enzymatischen Aktivität auf der Säule getrennt wurden, verhindert werden konnte.

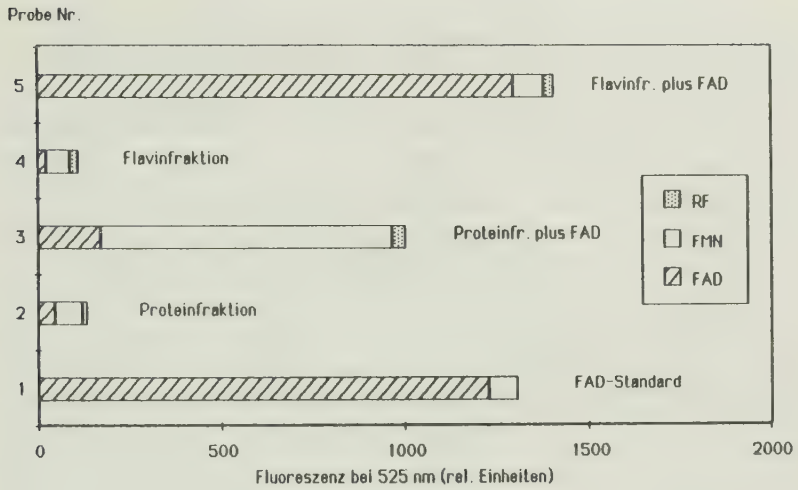

Fig. 3: FAD-Abbau in verschiedenen Säulenfraktionen. Fünf Tage alte Kulturen (300ml) wurden geerntet, die Zellen in 6ml aqua dest. lysiert und 20min bei 50 000g zentrifugiert. 6,6ml des Überstandes wurden auf die Sephadex G-50 Säule gegeben. Die freies Flavin enthaltenden Fraktionen bzw. die Proteinfraktionen des Säulenlaufes wurden gepoolt und halbiert. Jeweils eine Hälfte wurde für 10min im Kühlraum mit einem chromatographisch gereinigten FAD-Standard inkubiert. Die Abbaureaktion wurde durch Erhitzen der Proben für 10 min. auf 80°C in einem Wasserbad gestoppt, die Flavine wurden extrahiert und ihre Fluoreszenz bei 525nm vermessen. Gründe dafür, daß aus der Protein enthaltenden Probe 3) eine geringere Flavin-Gesamtmenge als aus Probe 5) extrahiert wurde, könnten ein teilweise vollständiger Abbau des zugegebenen Flavinstandards in dieser Fraktion oder eine Adsorption der Flavine an Protein sein.

E 1.2. Hemmung des Abbaus von FAD im Zell-Lysat

Der enzymatische Abbau von FAD durch Nucleotid-Pyrophosphatase in Kartoffeln wurde schon 1950 von Kornberg und Pricer beschrieben. Das Enzym ist nicht spezifisch für FAD, sondern baut auch andere Nucleotide mit Adenosin-Phosphobindungen wie ADP, ATP, NADH und NADPH ab. Die Pyrophosphatasen verschiedener Organismen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften wie pH-Optimum, Abhängigkeit von bestimmten Ionen oder Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren.

Ich versuchte zunächst, das Neurospora-Enzym mit verschiedenen Inhibitoren zu hemmen. Jodacetat (1mM), Fluorid (bis 0,5M) und Chlormercuribenzoat (bis 25mM) zeigten keinen Effekt. Der Versuch, vom Enzym spezifisch benötigte Ionen mit Citrat oder Oxalat zu komplexieren, mußte ebenfalls aufgegeben werden (nicht gezeigt); mit EDTA als Komplexbildner ergab sich dagegen ein deutlicher Hemmeffekt. Der Abbau eines zugegebenen FAD-Standards wurde in 5ml-Proben eines ungereinigten Lysats gemessen. In der Nullkontrolle für endogenes Flavin der Probe wurde in den 5,8nmol insgesamt extrahierten Flavinen eine Verteilung von 37% FAD, 50% FMN und 13% Rf gefunden. Ohne enzymatischen Umbau würde es bei Zugabe des Standards (23nmol) zu einer errechneten Verteilung von 84% FAD, 13% FMN und 13% Rf innerhalb der jetzt in den Proben vorhandenen 28,8nmol Flavin kommen. Nach Inkubation der Proben für 5min. bei Raumtempratur im Anschluß an die Zugabe von FAD lagen in der Probe, die kein EDTA enthielt, nur noch 37% des gesamten extrahierten Flavins als FAD vor, dagegen 53% als FMN und 10% als Riboflavin. Die Zugabe von EDTA (Endkonzentrationen 0,5 und 5mM) zum Lysat verlangsamte die Reaktion deutlich: Im gesamten extrahierten Flavin wurden 55% bzw. 59% FAD gefunden (Fig. 4).

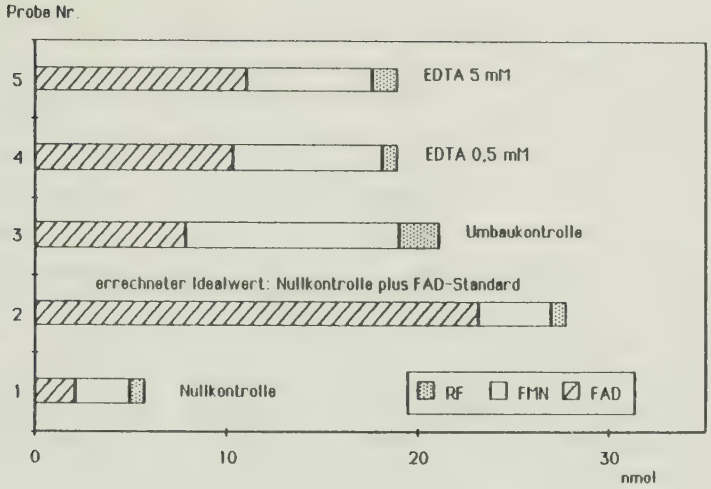

Fig. 4: Hemmung des FAD-Abbaus durch EDTA. Die "slime"-Zellen wurden in 20ml aqua dest. bei Raumtemperatur lysiert und in 5ml-Portionen geteilt. Die Kontrollen 1) und 3) wurden mit je 5ml aqua dest, die Proben 4) und 5) mit 5ml EDTA 1mM bzw. 10mM versetzt (Endkonzentration in den Proben 0,5 bzw. 5mM). Die Kontrolle für endogene Flavine des Lysats erhielt kein exogenes FAD (Nullkontrolle; 1). Die Kontrolle für ungehinderten FAD-Abbau (Umbaukontrolle; 3) und die Proben 4) und 5) wurden mit FAD-Standard versetzt und 5min. bei Raumtemperatur inkubiert. Der Umbau wurde durch Zugabe von 10ml heißem aqua dest. und 10minütige Inkubation der Proben bei 80°C gestoppt und die Flavine extrahiert wie beschrieben. Unter 2) ist die ohne Umbau theoretisch zu erwartende Flavinverteilung (näherungsweise errechnet aus endogenem Flavin der Nullkontrolle plus exogenem FAD-Standard) wiedergegeben.

Die Gesamtmenge der aus den Proben extrahierten Flavine erreichte mit 21,1nmol in der Probe ohne EDTA und 18,9nmol bei beiden getesteten EDTA-Konzentrationen nicht den theoretisch errechneten Wert von 28,8nmol (endogenes Flavin der Nullkontrolle plus zugegebener FAD-Standard). Der Grund für

diese Verluste ist die im Anschluß an die Inkubation des Lysats mit dem FAD-Standard zur Entfernung von Zellrückständen und Organellen eingesetzte 50 000g-Zentrifugation: Die Flavine wurden im klaren Überstand bestimmt, ein gewisser Prozentsatz wird jedoch immer mit den Membranen des 50 000g-Niederschlages präzipitiert.

In einem Kontrollexperiment wurde der Niederschlag zweimal mit Wasser nachextrahiert, um sicher zu sein, daß seine Flavinzusammensetzung der des Überstandes entsprach und daß nicht etwa FAD spezifisch an die Membranen gebunden wird. In der ersten Extraktion enthielten die aus den Membranen des Niederschlages extrahierten Flavine 28%, in der zweiten Extraktion 31% FAD. Diese Werte stimmten mit dem in den Flavinen des Überstandes gefundenen Prozentsatz an FAD (30%) überein. Zugegebenes oder endogenes FAD wird also nicht im Niederschlag angereichert.

Da die Zugabe von EDTA allein auch bei höheren Konzentrationen (bis 50mM, Daten nicht gezeigt) den FAD-Abbau nicht vollständig hemmen konnte, versuchte ich das während der Aufarbeitung vorliegende pH (6,0 bei in dest. Wasser lysierten Proben) in einen für den enzymatischen Abbau hemmenden Bereich zu verschieben. Wegen der erhöhten Photolabilität der Flavine unter alkalischen Bedingungen wurde im sauren Bereich gearbeitet.

Mitsuda et al. hatten 1970 über eine Hemmung des FAD-hydrolysierenden Enzyms in Spinat durch Phosphat berichtet. Ich benutzte daher ein Phosphat-enthaltendes Puffersystem. Die Flavinzusammensetzung der Lysat-Probe in Citrat-Phosphat-Puffer pH 4 erreichte mit FAD : FMN : Rf von 72% : 26% : 2% annähernd die ohne Abbau zu erwartende Zusammensetzung von 85% FAD, 12% FMN und 3% Rf (errechnet aus endogenem Flavin der Nullkontrolle und zugegebenem FAD-Standard), wogegen die Probe mit destilliertem Wasser nur 30% FAD, aber 52% FMN und 18% Rf enthielt (Tab. 2).

	%		
	FAD	FMN	Rf
errechnete Verteilung	85	12	3
(a) Lysat in dest. Wasser	30	52	18
(b) Lysat in Citrat-Phosphat-Puffer	72	26	2

Tab. 2: Hemmung des Umbaus von FAD und FMN durch niedrigen pH-Wert und Phosphat. Die Zellen von sieben Tage alten Kulturen (250ml) wurden in 15ml aqua dest. lysiert. Je 5 ml wurden mit a) 5ml aqua dest. bzw. b) 5ml Citrat-Phosphat (0,1M Citrat, mit 1M K_2HPO_4 auf pH 4 eingestellt) versetzt. Nach der Zugabe des FAD-Standards wurden die Proben 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Endogene Flavine (Nullkontrolle) und FAD-Standard wurden wie in Tab. 1 beschrieben bestimmt und die ohne Umbau zu erwartende Verteilung errechnet. Der in den Proben gemessene pH-Wert betrug 6,0 (a) bzw. 4,2 (b).

Eine andere Möglichkeit, die enzymatische Aktivität zu hemmen, bestand darin, sich die relativ niedrige Spezifität der Pyrophoshatase zunutze zu machen und dem Puffersystem andere, durch das Enzym nutzbare Substrate zuzusetzen. Pyrophosphat zeigte keinen Effekt und NADH interferierte mit dem für die Analyse der einzelnen Flavine benutzten Dünnschichtsystem (nicht gezeigt); eine gute Hemmung wurde jedoch nach Zusatz von 10mM AMP oder ADP erreicht: Bei einem errechneten FAD-Anteil am Gesamtflavin von 84% wurden in der AMP-enthaltenden Probe nach 15min Inkubation bei Raumtemperatur noch 72% FAD gemessen. In der ADP-Probe wurde der Umbau praktisch vollständig verhindert, 83% der gesamten extrahierten Flavine lagen als FAD vor. In der Umbaukontrolle (ohne zugegebenes Nucleotid) war der FAD-Anteil dagegen auf 23% gefallen (Fig. 4).

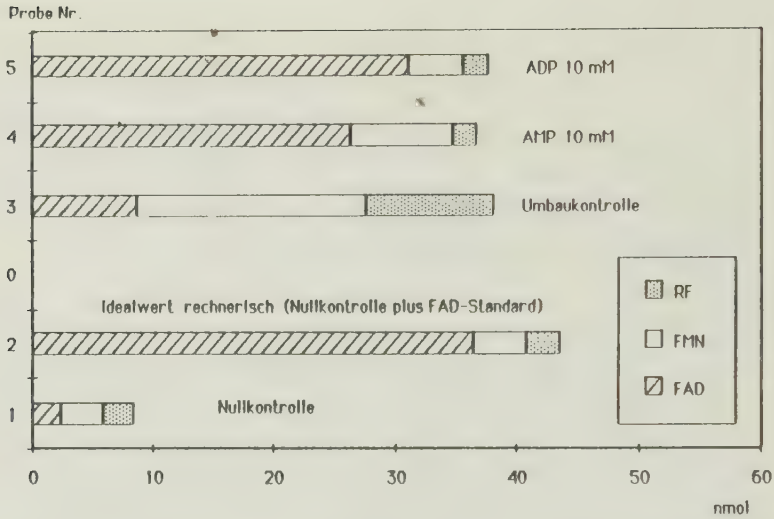

Fig. 4: Hemmung des Umbaus durch Adenosinnucleotide. Je 5ml Lysat wurden in 1) und 3) mit je 5ml aqua dest., in 4) mit 5ml AMP 20mM und in 5) mit 5ml ADP 20mM versetzt. Nach Zugabe des FAD-Standards zu 3), 4) und 5) wurden die Proben 15min bei Raumtemperatur inkubiert und aufgearbeitet wie beschrieben.

Da für die Trennung der Flavine auf der Sephadex-Säule größere Puffervolumina benötigt wurden, versuchte ich, an Stelle von ADP das billigere Triphosphat einzusetzen. Tab. 3 zeigt, daß ATP die enzymatische Umwandlung auch noch in einer Konzentration von 5mM inhibiert.

	%		
	FAD	FMN	RF
errechnete Verteilung	88	9	3
a) Lysat in dest. Wasser	10	49	41
b) 10mM ATP im Lysat	90	6	4
c) 5mM ATP im Lysat	86	11	3

Tab. 3: Hemmung des Umbaus durch ATP. Je 5ml Lysat wurden mit a) 5ml Dest., b) 5ml ATP 20mM und c) 5ml ATP 10mM versetzt. Nach der Zugabe des FAD-Standards wurden die Proben 15min bei Raumtemperatur inkubiert und aufgearbeitet wie beschrieben.

Alle die Nucleotidpyrophosphatase von Neurospora hemmenden Bedingungen wurden in einem Puffersystem vereinigt: 0,1M Citrat, mit 0,2M K_2HPO_4 auf pH 4 eingestellt, 5mM ATP und 0,5mM EDTA ("Schutzpuffer").

Um sicher zu sein, daß die Flavinzusammensetzung der Proben nicht durch Neusynthese von FAD aus FMN der Probe und ATP des Puffersystems zu höheren FAD-Anteilen hin verschoben wird, führte ich Kontrollexperimente mit externem FMN durch. Bei 50nmol zugegebenem FMN enthielt die in diesem Schutzpuffersystem lysierte Probe mit 78% denselben Anteil an FMN wie eine Kontrolle, deren Proteine vor der Zugabe des FMN-Standards durch Erhitzen denaturiert worden waren. Beide Werte stimmten zudem gut mit dem errechneten Anteil von FMN (endogenes Flavin der Probe plus zugegebener FMN-Standard) von 77% überein (Tab. 4). FMN (intern aus der Probe oder exogen) wird also nicht mit dem ATP des Puffersystems enzymatisch zu FAD gekoppelt.

	Fluoreszenz (Rel. Einheiten)					%			
	FAD	FU	FMN	Rf	Summe	FAD	FU	FMN	Rf
(1) Endogene Flavine	49	-	23	1	73	67	-	32	1
(2) FMN-Standard	-	26	325	28	379	-	7	86	7
(1+2) errechnet	49	26	348	29	452	11	6	77	6
Probe: (1+2) gemessen	43	29	391	36	499	9	6	78	7
Kontr.: (1) vor Zugabe von (2) erhitzt	47	31	395	36	509	9	6	78	7

Tab. 4: Zellen von zwei 5 Tage alten Kulturen (100ml) wurden in Schutzpuffer lysiert, 5x maschinell gepottert und für 15min bei Raumtemperatur mit einem nicht chromatographisch vorgereinigten FMN-Standard inkubiert (50nmol/Probe). Die Kontrolle wurde vor der FMN-Zugabe für 10min in einem Wasserbad auf 100°C erhitzt. FU = Unbekannte Verunreinigung der kommerziellen FMN-Präparation

Die Zusammensetzung der endogenen freien Flavine von Neurospora "slime" in Abhängigkeit vom Kulturalter wurde mit dem in den Hemmversuchen entwickelten Schutzpuffersystem und soweit wie möglich beschleunigter Probenaufarbeitung bestimmt (Tab. 5).

Kulturalter	% FAD	FMN	Rf
3 Tage	50	47	3
4 "	51	48	1
5 "	47	46	7
6 "	46	50	4
7 "	47	51	2

Tab. 5: Zusammensetzung der freien Flavine von Neurospora crassa "slime" in Abhängigkeit vom Kulturalter. Die "slime"-Zellen (150-200ml Kultur) wurden in 4,5-6ml eiskaltem Schutzpuffer lysiert, vorsichtig 5x von Hand gepottert und 20min bei 50 000g zentrifugiert. 2,5ml des Überstandes wurden auf eine Sephadex G-50-Säule geladen und mit Schutzpuffer bei einer Geschwindigkeit von 1Tropfen/5sec eluiert. Dauer des Säulenlaufs bei 4°C: ca. 5 Stunden.

E 2. Versuche zur Isolierung von Plasmamembran

1977 hatten Brain et al. die Blaulichtsensitivität der Cytochrom b-defizienten Mutante Neurospora crassa poky-band untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuteten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Gehalt des Mycels an photoreduzierbarem b-Typ Cytochrom einerseits und einer physiologischen Blaulichtantwort (der Unterdrückung der rhythmischen Conidienbildung) andrerseits hin. Weitere Versuche (Brain et al. 1977b) mit einer Albino/timex-Mutante zeigten, daß ein photoreduzierbares b-typ Cytochrom in einer Serie differenzieller Zentrifugationen offenbar zusammen mit der Plasmamembran sedimentierte; mit dieser Technik konnten jedoch keine hochgereinigten Membranfraktionen erzielt werden. 1981 berichteten Leong und Briggs über eine Methode zur Reinigung von Mais-Plasmamembran über Saccharose- und Renografin-Gradienten. Die gereinigte Plasmamembranfraktion enthielt ein photoreduzierbares b-typ Cytochrom. Das Differenzspektrum zeigte, daß die Fraktion weitgehend frei von Verunreinigung durch andere Cytochrome war, es gab jedoch keinen Hinweis auf eine physiologische Signifikanz der Photoreduktion, die nach Belichtung mit Blaulicht in dieser Membranpräparation beobachtet wurde. Ein solcher Hinweis könnte möglicherweise mit hochgereinigter Plasmamembran von Neurospora crassa erbracht werden, falls a) die Plasmamembran des Pilzes ebenfalls dieses Cytochrom enthält und b) ähnlich hoch gereinigt werden könnte wie die Membran der grünen Pflanze.

E 2.1. Dichtegradienten

Bei der von Leong und Briggs (1981a) für die Reinigung der Plasmamembran von Mais entwickelten Methode wurden zunächst die Membranen des Endoplasmatischen Reticulums in einer

16stündigen Zentrifugation bei 100 000g auf einem Saccharosegradienten abgetrennt. Der nachgeschaltete Renografingradient diente zur Trennung von Plasmamembran (PM) und mitochondrialen Membranen. Ich versuchte, auf der Basis dieser Versuche eine Methode für die Reinigung der Plasmamembran von Neurospora crassa al-2 bd zu entwickeln, die unter geringem Zeitaufwand und mit der zur Verfügung stehenden Rotor- und Zentrifugenausrüstung durchgeführt werden konnte.

Bei Versuchen mit kontinuierlichen und mit verschieden abgestuften Saccharosegradienten sowie Renografingradienten unterschiedlicher Steilheit zeigte sich bald, daß die hartnäckigste Verunreinigung der Plasmamembran-Fraktion durch mitochondriale Membranen hervorgerufen wurde. Tieftemperaturspektren in einem computerisierten Einstrahl-Spektralphotometer nach Butler (1972) zeigten in allen Fraktionen deutlich das Vorhandensein mitochondrialer Cytochrome. Meine Anstrengungen konzentrierten sich daher auf eine Verbesserung der Trennung von PM und Mitochondrien durch Variation der Bedingungen bei der Renografingradienten-Zentrifugation und bei der Aufarbeitung. Ein Beispiel für einen solchen Versuch zeigt Tab. 6. Die Fraktion Nr. 2 des Renografingradienten enthielt noch 0,6% der gesamten im Homogenat gemessenen PM-ATPase-Aktivität und 0,04% der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität. Das entspricht einer 15fachen Anreicherung des Plasmamembran-Materials gegenüber mitochondrialen Membranen in dieser Fraktion.

Obwohl bei Versuchen mit verschiedenen Renografingradienten der Hauptteil der CCO-Aktivität stets in einen dichteren Bereich des Gradienten wanderte als das Maximum der PM-ATPase, zog sich ein Hintergrund von mitochondrialer Kontamination durch den gesamten Gradienten. Die PM-ATPase-Aktivität erschien ebenfalls nicht als scharfe Bande, sondern über einen großen Teil des Gradienten verteilt.

	Gesamtaktivität/Fraktion		
	PM-ATPase	CCO	CCR
Homogenat	503 965	381 752	179 928
2 KP	573 580	30 464	0
10 KP	35 105	251 328	15 232
100 KÜ	70 210	12 376	73 304
Reno-Gr. Frakt.-Nr.			
1	842	169	112
2	3 019	169	786
3	3 019	561	786
4	2 036	899	168
5	1 895	1 348	0
6	-	1 685	-
7	772	1 853	0
8	702	2 134	0
9	2 316	1 909	0
10	2 246	2 190	0

Tab. 6: Reinigung von Neurospora-Membranmaterial (100 000g-Präzipitat, siehe M 4.1.1.) auf einem Renografin-gradienten (10-30%, siehe M 4.2.1.). Der Gradient wurde bei 4°C in einem Beckmann-Rotor SW 25-1 bei 58 000g 90min zentrifugiert. Die Enzymaktivitäten von PM-ATPase, Cytochrom c-Oxidase (CCO)und NADH-abhängiger Cytochrom c-Reduktase (CCR) sind in nmol des in der jeweiligen Versuchszeit umgesetzten Substrats (ATP bzw. Cyt. c) pro Gesamtfraktion angegeben.
2 KP; 10 KP: 2 000 bzw. 10 000g-Präzipitat. 100 KÜ: 100 000g-Überstand.

E 2.2. "Phase partition" im Tris-Citrat-Puffersystem

Eine mögliche Erklärung für die schlechte Trennung von Neurospora-PM und -Mitochondrien auf Renografingradienten wäre, daß beim Aufschluß des Materials in der Dynomühle durch Zerstörung der Organellen eine sehr gemischte Population von Plasmamembran- und mitochondrialen Vesikeln unterschiedlicher Größe gebildet wird. Die PM-Vesikel könnten dabei durch anhaftende Zellwandbruchstücke zusätzlich noch in der Dichte variieren. Es schien daher notwendig, eine Methode anzuwenden, die Membranvesikel nicht nach Größe oder Dichte, sondern aufgrund von Oberflächeneigenschaften trennt.

Eine solche Methode ist das "Phase partitioning"-Verfahren in Zweiphasensystemen aus Polyäthylenglycol (PEG) und Dextran. Sobald die Konzentration dieser beiden Polymere in einer wässrigen Lösung einen bestimmten "kritischen Punkt" (s.u.) überschreitet, bilden sich in dem zuvor homogenen Gemisch zwei Phasen aus, zwischen denen eine Potentialdifferenz besteht. In das System eingebrachte Substanzen separieren zwischen der oberen (PEG-angereicherten) und unteren (Dextran-angereicherten) Phase entsprechend ihren Lösungseigenschaften und ihrer Ladung. Die Verteilung zwischen den Phasen wird dabei von verschiedenen Parametern wie der Konzentration der beiden Polymere, Salzkonzentration und -spezies, pH, Temperatur usw. beeinflußt und kann durch Variation dieser Parameter gesteuert werden (Albertsson 1971, Johansson1974 a, b).

Da die Aktivität der Plasmamembran-ATPase über die Freisetzung von anorganischem Phosphat gemessen wurde, setzte ich ein phosphatfreies Puffersystem ein. Um die optimalen Bedingungen für die Reinigung der Neurospora-Plasmamembran zu finden, wurden die einzelnen Parameter der Zweiphasen-Systeme systematisch variiert. Wie üblich wurden als erstes verschiedene Polymerkonzentrationen ausgetestet.

In meinem System (250mM Saccharose; 5mM Tris-Citrat pH 7,5) lag der kritische Punkt, das heißt die niedrigste Polymerkonzentration, bei der sich noch zwei Phasen ausbilden, bei 4,6%. Von größter Bedeutung für diesen Wert ist die Temperatur, bei der der Versuch durchgeführt wird. So vermischte sich ein 4,8%iges Phasensystem überhalb 7°C, während andererseits ein 4,65%iges System bei 0-2°C noch zwei Phasen ausbildete. Um unter möglichst kontrollierten Bedingungen zu arbeiten, wurden daher die Versuche im Kühlraum durchgeführt, wobei die Systeme im Eiswasserbad gehalten und in mit Eiswasser gefüllten Rotorbechern zentrifugiert wurden.

E 2.2.1. Variation der Polymerkonzentration

Versuchsreihen mit Konzentrationen zwischen 4,6% und 7% (w/w) zeigten mit sinkender Polymerkonzentration zwar eine Zunahme der Menge an Membranmaterial in der Oberphase, jedoch keine Anreicherung von Plasmamembran (gemessen am Verhältnis Plasmamembran-ATPase/Cytochromoxidase). Es mußte daher versucht werden, die Trennleistung durch Feinabstimmung (Variation z. B. von Salzkonzentrationen oder pH) zu verbessern.

E 2.2.2. Variation der Salzkonzentration

Für diese Versuche wurde eine Polymerkonzentration von 4,8% gewählt. Diese Konzentration erbrachte eine gute Ausbeute in der Oberphase und lag genügend weit vom kritischen Punkt entfernt, um eine sichere Phasentrennung zu gewährleisten. In verschiedenen Versuchsreihen wurde zunächst der Einfluß von KCl auf die Verteilung untersucht. Generell wanderte mit steigender KCl-Konzentration ein immer größerer Prozentsatz des in den jeweiligen Proben eingesetzten

Materials in die Unterphase. Tab. 7 zeigt Ergebnisse aus einer Versuchsreihe, bei der die KCl-Konzentration zwischen 0,5 und 3,5mM variiert wurde. Der in den Oberphasen gemessene Proteinanteil fiel dabei von 71% (Anteil am gesamten Protein in der jeweiligen, aus Ober-, Mittel- und Unterphase bestehenden Probe) bei 0,5mM auf 8% bei 3,5mM KCl. Bei allen KCl-Konzentrationen wurde dabei ATPase gegenüber CCO in der Oberphase angereichert. So enthielt z. B. die Oberphase des Systems mit 1,5mM KCl nur 20% der gesamten in diesem System gemessenen CCO-Aktivität, aber 51% des Proteins und 59% der ATPase-Aktivität.

KCl (mM)	% in der Oberphase		
	ATPase	CCO	Protein
0,5	77	60	71
1,0	63	48	64
1,5	59	20	51
2,0	40	18	31
2,5	25	14	17
3,0	17	2	12
3,5	15	3	8

Tab. 7: Einfluß der KCl-Konzentration auf die Verteilung der 50 000g-Membranfraktion im Tris-Citrat-System bei pH 7,5. Die 5ml-Systeme enthielten 250mM Saccharose; 5mM KPi pH 7,5; je 4,8% der beiden Polymere und die angegebenen Konzentrationen an KCl. Nach dem Verteilungsschritt wurde jede Probe in Ober-, Mittel- und Unterphase getrennt und jede Phase auf Protein, PM-ATPase- und CCO-Aktivität untersucht. Die in allen drei Phasen einer Probe gemessene Gesamtmenge wurde gleich 100% gesetzt. Die Anteile in der Oberphase werden als % dieser Menge angegeben.

E 2.2.3. Gegenstromlauf

Um die Reinigung zu erhöhen, wurden manuelle Gegenstromläufe mit 8 Verteilungsschritten in den üblichen 5ml-Systemen durchgeführt, wobei jeweils nach dem Durchmischen und der Zentrifugation zur Phasentrennung die Oberphasen mit der Pasteurpipette abgesaugt und ins nächste Gläschen überführt wurden. Die Unterphasen und die Phasengrenze blieben dabei stationär. Obwohl die Oberphasen dabei siebenmal gegen frische Unterphase gewaschen wurden, konnte PM-ATPase gegenüber CCO lediglich vierfach angereichert werden (Fig. 5). Die Oberphase des Systems 8 enthielt 3,8% des gesamten, in allen Ober- und Unterphasen enthaltenen Proteins, 4,1% der gesamten ATPase- und 1,1% der CCO-Aktivität.

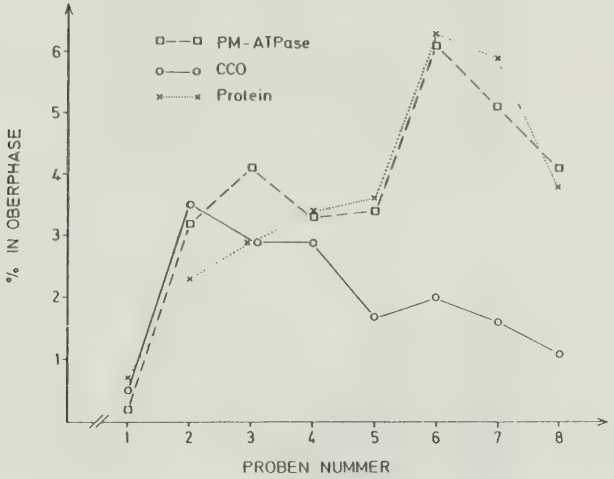

Fig. 5: Gegenstromlauf im Tris-Citrat-System pH 7,5. Die 5ml-Systeme enthielten 250mM Saccharose; 5mM KPi pH 7,5; 4,8% Polymer und 1,5mM KCl. Nach dem letzten Verteilungsschritt wurden die Proben in Ober- und Unterphase getrennt (die Unterphase enthält die Phasengrenze) und auf Protein, PM-ATPase- und CCO-Aktivität untersucht. Die in den Ober- und Unterphasen aller acht Systeme gefundene Gesamtmenge wurde jeweils gleich 100% gesetzt. Die Aktivitäts- bzw. Proteinanteile in den Oberphasen werden als % dieser Menge angegeben.

E 2.2.4. Variation der Salzspezies

Fig. 6 zeigt den Versuch, die Trennleistung durch Variation der eingesetzten Anionen zu verbessern. Das System erwies sich als relativ unempfindlich gegenüber Phosphat, selbst bei 20mM Kaliumphosphat enthielt die Oberphase noch mehr als 60% des gesamten in dieser Probe gemessenen Proteins (Fig. 6a), während Bromidkonzentrationen über 10mM das gesamte Material in die Unterphase trieben (Fig. 6b). Die Trennleistung übertraf jedoch in keinem Fall die vorher mit KCl-Versuchsreihen (Tab. 7) erzielten Werte.

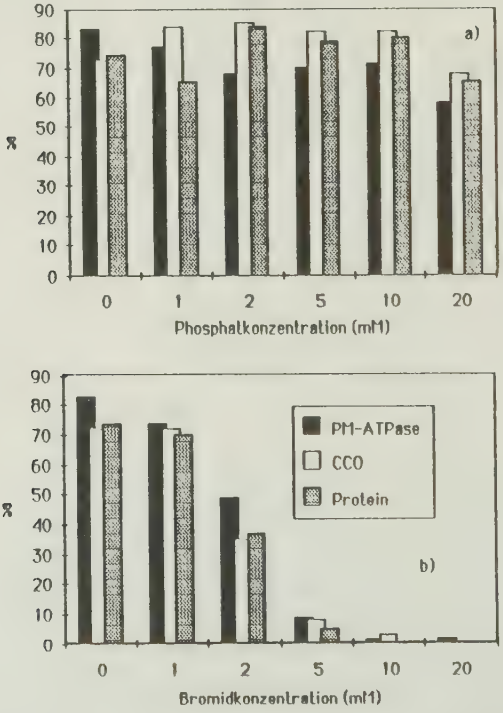

Fig. 6: Einfluß der KPi- und der KBr-Konzentration auf die Verteilung der Membranen. Bedingungen und Auswertung wie in Tab. 7, jedoch an Stelle von KCl mit KBr bzw. KH_2PO_4-K_2HPO_4-Lösung pH 7,5.

E 2.2.5. Variation des pH

Bei Variation des pH zwischen 5,5 und 9 wurde in mehreren Versuchsreihen die beste Anreicherung bei pH-Werten um 8,5 erzielt. Die höhere Pufferkonzentration in diesen Versuchen (siehe M 4.2.2) bewirkte bei den bisher verwendeten KCl-Konzentrationen (1-2mM) eine fast vollständige Verlagerung des Materials in die Oberphase. KCl wurde daher in den pH-Reihen 11mM eingesetzt. Tab. 8 zeigt die spezifische Aktivität der PM-ATPase in den einzelnen Phasen aus einer Versuchsreihe zwischen pH 7,5 und 9. Die spezifische Aktivität erreichte in den Oberphasen der Proben 3 und 4 (pH 8,52 bzw. 8,80) mit 643 und 661 nmol/min und mg Protein die höchsten Werte. Dabei enthielt beim pH 8,52 die Oberphase 43% der in der gesamten Probe (Ober-, Mittel- und Unterphase) gemessenen ATPase-Aktivität, jedoch nur 21% der CCO-Aktivität und 12% des Proteins.

Probe Nr	pH	ATPase (nmol min^{-1} mg^{-1}) Oben	Mitte	Unten
1	7,75	262	164	96
2	8,12	242	153	42
3	8,52	643	138	48
4	8,80	661	162	41
5	9,01	262	153	220

Tab. 8: Einfluß des pH auf die ATPase-Verteilung. Die 5ml-Systeme enthielten 4,8% Polymer und 11mM KCl. Einstellung und Messung des pH siehe M 4.2.2. Die beim jeweiligen pH in Ober-, Mittel- und Unterphase gemessene PM-ATPase-Aktivität wurde auf Protein bezogen.

E 2.2.6. Variation der KCl-Konzentration bei pH 8,5

Durch Variation der Salzkonzentration bei pH 8,5 wurde versucht, die Trennung weiter zu verbessern. Bei einer Konzentration von 12mM KCl enthielt die Oberphase mit 260µg 17% des gesamten Proteins dieser Probe, Mittel- und Unterphase 64% und 19%. Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten in der Oberphase betrug 2,0, was einer vierfachen Anreicherung des Plasmamembranmarkers gegenüber dem 50 000g-Ausgangsmaterial (ATPase/CCO = 0,5) entspricht (Tab. 9,10 und 11).

KCl	ATPase (nmol min^{-1} mg^{-1})		
mM	Oben	Mitte	Unten
10	540	338	254
11	696	382	219
12	722	319	229
13	796	312	228
14	921	345	262

Tab. 9: Spezifische Aktivität von PM-ATPase in einer KCl-Reihe bei pH 8,5.

KCl	CCO (nmol min^{-1} mg^{-1})		
mM	Oben	Mitte	Unten
10	771	663	634
11	787	858	441
12	366	699	539
13	634	687	668
14	232	777	589

Tab. 10: Spezifische Aktivität von CCO in einer KCl-Reihe bei pH 8,5.

KCl mM	Protein (ug/Phase) Oben	Mitte	Unten
10	432	746	210
11	290	776	302
12	260	980	300
13	180	1080	356
14	164	980	436

Tab. 11: Proteingehalt der einzelnen Phasen in einer KCl-Reihe bei pH 8,5.

Unter diesen Bedingungen (pH 8,5; 12mM KCl) wurden Versuche mit einer dreistufigen Gegenstromreinigung in vergrößerten Phasensystemen unternommen. Ergebnisse aus einem solchen Versuch zeigt Tab. 12. Die zweifach gewaschene Oberphase 3 enthielt 6,3% (760µg) des gesamten im Versuch eingesetzten Proteins (12mg), aber 17,3% der eingesetzten ATPase-Aktivität gegenüber 2,7% der CCO-Aktivität bei einem Verhältnis der spezifischen Aktivitäten von PM-ATPase zu CCO von 6,6. Das entspricht einer 6,6fachen Reinigung gegenüber dem 50 000g-Ausgangsmaterial (PM-ATPase/CCO = 1,0).

	Aktivität (nmol min^{-1} mg^{-1}) ATPase	CCO	ATPase / CCO	mg Protein / Fraktion
Ausgang	483	461	1,0	12
Oberp. 1	601	453	1,3	1,04
" 2	696	329	2,1	1,14
" 3	1320	200	6,6	0,76
Unterp. 1	432	390	1,1	1,22

Tab. 12: Gegenstromexperiment mit drei Verteilungsschritten in 10ml-Systemen mit 12mM KCl; pH 8,5. Unterphasen mit Phasengrenze stationär, Oberphasen bewegt. Spezifische Aktivitäten von PM-ATPase und CCO bezogen auf mg Protein.

E 2.3. "Phase partition" im Phosphat-Puffersystem

Da die bisher mit der "Partitioning"-Technik erzielten Reinigungsergebnisse nicht befriedigten, wurden Versuche bei C. Larsson am Biochemischen Institut der Universität von Lund nach den dort für die Isolation von Plasmamembran grüner Pflanzen entwickelten Methoden (Widell und Larsson 1981) durchgeführt. Die wichtigsten Unterschiede zu dem von mir für Neurospora entwickelten System liegen in den höheren Polymerkonzentrationen (5,5-6,5%) und der Verwendung von Kaliumphosphat-Puffer (5mM, pH 7,8) an Stelle von Tris-Citrat-Puffer (Herstellung der Phasensysteme und Durchführung siehe M 4.2.3).

E 2.3.1. Variation der Polymerkonzentration

In einer Serie mit 4ml-Systemen wurde zunächst die Polymerkonzentration zwischen 5,5 und 6,5% in 0,2%-Schritten variiert (Fig. 7).

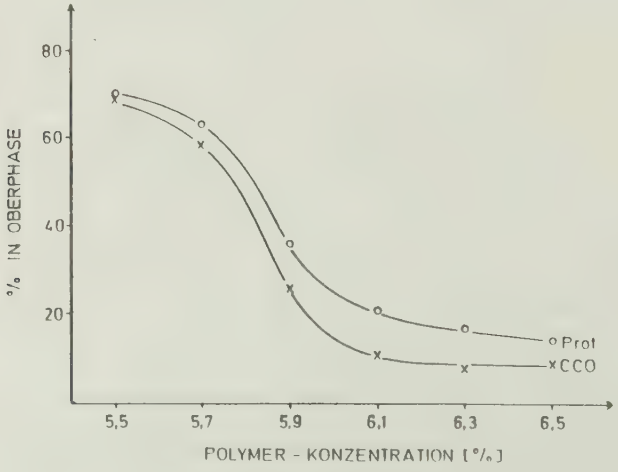

Fig. 7: Legende siehe nächste Seite.

Fig. 7: Verteilung der 50 000g-Membranfraktion im Phosphat-gepufferten System (5mM KPi pH 7,8) in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration. Im Anschluß an die Verteilung wurden Ober- und Unterphase getrennt und mit KPi auf 5ml aufgefüllt. Protein und CCO-Aktivität wurden direkt in den so verdünnten Phasen bestimmt. Die in der Ober- und Unterphase jedes Systems gemessene Gesamtmenge wurde gleich 100% gesetzt und der Anteil der einzelnen Oberphasen gegen die Polymerkonzentration aufgetragen.

Wie im Tris-Citrat-System nahm bei steigender Polymerkonzentration die CCO-Aktivität in der Oberphase schneller als der Proteingehalt ab. Bei Konzentrationen über 5,7% muß jedoch eine deutliche Verringerung der Ausbeute in Kauf genommen werden.

E 2.3.1. Variation der KCl-Konzentration

Um das Problem der niedrigen Ausbeute bei hohen Polymerkonzentrationen zu umgehen, versuchten wir die Trennungseigenschaften durch Zugabe von Salz an Stelle von Erhöhung der Polymerkonzentration zu verbessern. In einer Serie mit 4ml-Systemen wurde die KCl-Konzentration zwischen 0 und 3mM in 1mM-Schritten variiert. Zunehmende Salzkonzentration trieb die Membranen schnell von der Ober- in die Unterphase, bei 3mM KCl im System enthielt die Oberphase nur noch 7% des Proteins der Probe (Fig. 8). Wie schon in der Polymerserie (Fig. 7), nahm auch bei steigender Salzkonzentration die CCO-Aktivität in der Oberphase schneller ab als der Proteingehalt.

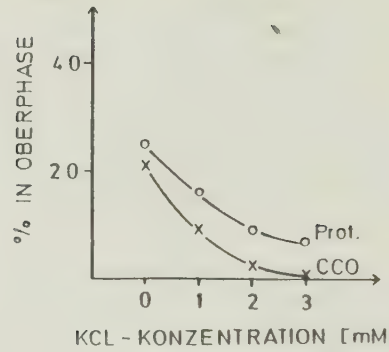

Fig. 8: Verteilung der 50 000g-Membranfraktion im Phosphat-gepufferten System (5mM KPi pH 7,8) in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Die Systeme enthielten 5,5% Polymer und 0-3mM KCl. Auswertung s. Fig. 7.

E 2.3.3. Versuche in 16ml-Systemen

Die beste Verringerung der mitochondrialen Kontamination in der Polymerserie war bei Konzentrationen über 6% erzielt worden. Wir wählten daher eine Konzentration von 6,3% für den ersten Versuch mit zweistufiger Verteilung in vergrößerten (16ml-) Systemen.

Nach dem ersten Verteilungsschritt wurden Ober- und Unterphase getrennt, mit frischer Gegenphase versetzt und erneut durchmischt. Daraus resultieren nach dem zweiten Verteilungsschritt die gewaschenen Ober- und Unterphasen O_2 und U_2 mit ihren jeweiligen Gegenphasen UO_2 und OU_2 (siehe Fig. 1). Zur Kontrolle auf unspezifische, durch das Phasenmaterial oder die Aufarbeitung hervorgerufene Effekte wurden Aliquots der Membranfraktion mit Ober- bzw. Unterphase versetzt (O_K bzw. U_K) und aufgearbeitet wie die Proben.

Nach zwei Verteilungsschritten war zwar mitochondriales Material in der gewaschenen Unterphase U_2 um den Faktor 1,46 angereichert worden (berechnet aus dem jeweiligen Verhältnis PM-ATPase/CCO in U_2 und der Kontrolle U_K), der Proteingehalt in der gewaschenen Oberphase O_2 war jedoch so gering, daß keine ATPase-Aktivität gemessen wurde und daher kein Reinigungsfaktor berechnet werden konnte.

Ein gangbarer Kompromiß zwischen Reinigung und Ausbeute in einer Zweistufen-Reinigung schien entweder durch Systeme mit niedriger Polymer- und hoher Salzkonzentration oder durch die Verwendung von unterschiedlichen Polymerkonzentrationen im ersten und zweiten Verteilungsschritt möglich zu sein: Eine niedrige Polymerkonzentration im ersten Schritt würde zu einer größeren Menge von Material in der Oberphase des ersten Systems führen. O_1 und U_1 würden dann gegen Phasen mit höherer Polymerkonzentration gewaschen, um die Reinigung im zweiten Verteilungsschritt zu erhöhen.

Beide Methoden wurden in parallelen Versuchen mit demselben 50 000g-Niederschlag getestet. Die Daten in Tab. 13 zeigen, daß:

1) die Ausbeute von Membranmaterial in der gewaschenen Oberphase O_2 durch die Verwendung einer niedrigen Polymerkonzentration im ersten Schritt erhöht wird: 3,1mg, verglichen mit 0,133mg bei der ersten zweistufigen Reinigung mit 6,3% Polymer in beiden Schritten (s. o.). Das Material war jedoch nicht mit Plasmamembran angereichert (Gleiches Verhältnis PM-ATPase/CCO in O_2 und der Kontrolle O_K).
2) im KCl-Versuch der Plasmamembran-Marker um den Faktor zwei gereinigt wurde, gemessen an den jeweiligen Verhältnissen PM-ATPase/CCO in O_2 (0,32) und O_K (0,15).

		PM-ATPase (nmol $min^{-1}mg^{-1}$)	CCO (nmol $min^{-1}mg^{-1}$)	Protein mg/ml	PM-ATPase CCO
Polymer-	O_2	68	468	3,1	0,15
exp.	U_2	104	489	4,8	0,21
	O_2	113	356	1,6	0,32
Salz-	UO_2	118	402	1,625	0,29
exp.	OU_2	104	472	1,625	0,22
	U_2	60	246	8,3	0,24
Kon-	O_K	77	516	1,6	0,15
trollen	U_K	88	493	1,375	0,18

Tab. 13: Zweistufen-Reinigung in 16ml-Systemen mit a) unterschiedlicher Polymer-Konzentration im ersten und zweiten Schritt und b) niedriger Polymer- und hoher Salzkonzentration. Im Polymer-Experiment wurde der erste Verteilungsschritt bei 5,7%, der zweite bei 6,3% Polymer (kein Salz) durchgeführt. Die Daten der beiden Waschphasen (siehe M 4.2.3.) sind nicht aufgeführt. Im Salz-Experiment enthielten die Systeme 5,5% Polymer und 3mM KCl.

Die Tatsache, daß selbst mit einer Zweischritt-Methode nur eine zweifache Reinigung zu erzielen war, konnte auf einen niedrigen Verteilungsquotienten oder/und Kreuzkontamination der Vesikel zurückzuführen sein: Möglicherweise werden während des Homogenisierungsschrittes durch größere Membranfragmente, die sich wieder zu Vesikeln ordnen, Membranen anderen Ursprungs eingeschlossen. Es wäre unmöglich, diese Membranen durch eine Erhöhung der Anzahl an Verteilungsschritten zu beseitigen, da sie nicht in Kontakt mit dem Phasensystem stehen. Ich versuchte deshalb, die Vesikel nach dem ersten Verteilungsschritt aufzubrechen, um eingeschlossene Verunreinigungen freizusetzen und im zweiten Schritt zu beseitigen.

Die 16ml-Systeme enthielten 5,5% Polymer und 3mM KCl. Nach dem ersten Schritt wurden die Phasen getrennt und die Oberphase in drei gleiche Teile geteilt. Ein Teil wurde in einem Eiswasserbad mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier mit Mikrospitze; 10 x 1sec mit jew. 4sec. Pause), der zweite Teil lief einmal durch eine Yeda-Presse, der dritte blieb unbehandelt und diente als Kontrolle. Nach der Behandlung wurde eine entsprechende Menge Unterphase zugegeben und der zweite Verteilungsschritt durchgeführt. In diesem Experiment stellte sich heraus, daß:

1) die gesamte in der jeweiligen Probe gemessene Proteinmenge von 1,105mg in der Kontrolle auf 1,030mg in der Yeda-Presse-behandelten und 0,893mg in der ultrabeschallten Probe fiel. Dies könnte eine Folge des Aufbrechens der Vesikel und der damit verbundenen Freisetzung von kleineren Membranfragmenten und/oder löslichen Proteinen sein, die teilweise durch den zur Konzentrierung des Phasenmaterials eingesetzten Zentrifugationsschritt verloren gehen.
2) Obwohl beide Behandlungen offenbar die Vesikel zerstörten, wobei der Sonifier effektiver als die Yeda Presse arbeitete, wurde die Reinigung der Plasmamembran in der Oberphase, gemessen am PM-ATPase/CCO-Verhältnis, nicht verbessert: 0,27 in der ultrabeschallten und 0,26 in der gepreßten Probe gegenüber 0,28 in der Kontrolle.
3) Die Zerstörung der Vesikel verringerte die spezifische Aktivität von CCO in der Oberphase: 459 (Ultraschall) und 468 (Yeda Presse) nmol min^{-1} mg^{-1} verglichen mit 523 nmol in der Kontrolle, wobei die Aktivität von CCO in den jeweiligen Unterphasen zunahm (nicht gezeigt), aber
4) die spezifische Aktivität der ATPase in den jeweiligen Phasen wurde parallel verschoben, daher blieb das ATPase/CCO-Verhältnis unverändert.

Da mitochondriale Membranen von Neurospora, im Gegensatz zu Material aus höheren Pflanzen, unter allen bisher getesteten Bedingungen keine eindeutige Affinität für die Unterphase gezeigt hatten, überprüfte ich die Ergebnisse der Cytochromoxydase-Messungen durch den Einsatz eines anderen mitochondrialen Markers, Succinat Dehydrogenase (SDH). In einem Zweistufen-Experiment mit 5,5% Polymer und 2mM KCl fiel die spezifische Aktivität der SDH von 298 (Mittelwert der Kontrollen) auf 223 nmol h^{-1} mg^{-1} in der gewaschenen Oberphase O_2, was einer Abnahme von 24% entspricht. Diese geringfügige Abnahme der spezifischen Aktivität bestätigt die Ergebnisse der Cytochromoxydase-Messungen.

E 2.3.4. Maschineller Gegenstromlauf

Die bisherigen Experimente hatten gezeigt, daß bei Neurospora, im Gegensatz zu höheren Pflanzen, eine zufriedenstellende Trennung von Plasmamembran und Mitochondrien durch "Partitioning"-Methoden mit wenigen Verteilungsschritten schwierig zu erreichen war. Das von Albertsson (1971) für Gegenstrom-Verteilungen entwickelte Gerät bot die Möglichkeit, eine Verteilung mit 60 Schritten durchzuführen. Bei dieser Konstruktion wird die untere Phase stationär gehalten, daher enthalten die ersten Fraktionen Material mit hoher Affinität zur Unterphase, z. B. Mitochondrien, während die Plasmamembran, zusammen mit der bewegten Oberphase, in die letzten Kammern des rotierenden Aufbaus wandern sollte. Fig. 9 zeigt das Ergebnis eines Gegenstromlaufes bei 5.9% Polymer und ohne KCl. Trotz der großen Anzahl von Verteilungsschritten war es nicht möglich, PM-ATPase und CCO wesentlich voneinander zu trennen.

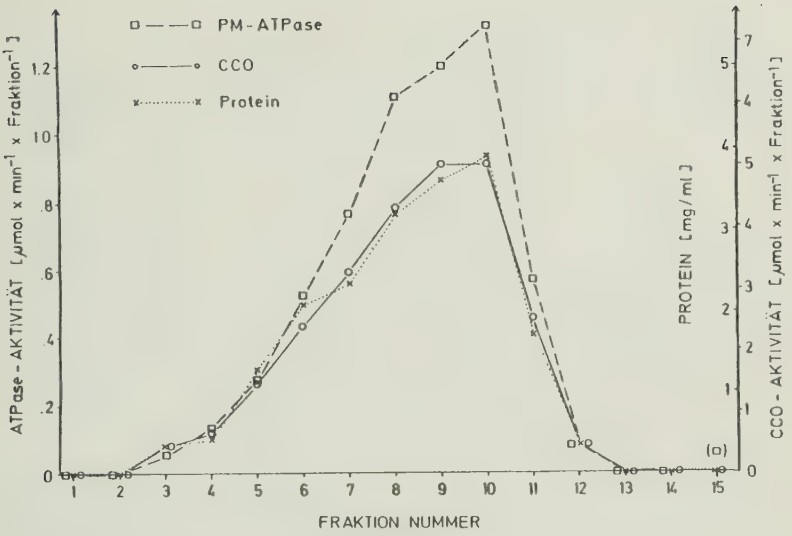

Fig. 9: Gegenstromverteilung von 50 000g-Material in einem 60-Kammer-Gerät. Die Systeme enthielten 5.9% Polymer und kein Salz. Nach der Verteilung wurden jeweils 4 Proben vereinigt und die resultierenden 15 Fraktionen auf Protein, PM-ATPase- und CCO-Aktivität untersucht.

E 3. Nitratreduktaseversuche

In Neurospora wird die Fähigkeit des Mycels, Conidien zu bilden, von der Stickstoffquelle des Mediums beeinflußt (Weiss und Turian 1966; Klemm-Wolfgramm 1979): In Mycel, das auf Medium mit Nitrat als einziger N-Quelle angezogen wird, kann ca. 8 Stunden nach Beginn von Substratmangelbedingungen Conidienbildung beobachtet werden (Klemm-Wolfgramm 1979). Unter diesen Anzuchtbedingungen ist die Nitratreduktase des Mycels voll induziert. Bei Mycel, das auf gemischtem Ammonium-Nitrat-Medium, d. h. unter für die Nitratreduktase reprimierenden Bedingungen, angezogen wurde, setzt dagegen die Conidienbildung, wenn überhaupt, erst später ein.

Möglicherweise spielt die Nitratreduktase (NR) bei der Photostimulation der Conidienbildung in der Neurospora-Mutante al-2 bd die Rolle eines Schlüsselenzyms (Klemm und Ninnemann 1979): NR von Neurospora enthält FAD und ein photoreduzierbares Cytochrom b (Garrett und Nason 1967; Ninnemann 1982), erfüllt also die Bedingungen eines potentiellen Blaulichtrezeptors. Das Enzym verliert unter Hungerbedingungen, möglicherweise durch Dissoziation in verschiedene Untereinheiten, die Fähigkeit, Nitrat unter Verwendung des natürlichen Substrats NADPH zu reduzieren (Gesamtaktivität). Der terminale Teil der Elektronentransportkette des Enzyms, d. h. die MVH-Nitrat-Aktivität, wird nicht in gleicher Weise beeinflußt (Klemm-Wolfgramm 1979). Unter Umständen ist das Enzym unter diesen Bedingungen für einen Lichtreiz besonders empfänglich.

Die Photostimulation der Conidienbildung könnte durch eine Reaktivierung der Gesamtaktivität des Enzyms, entweder durch Zusammenführung von getrennten Untereinheiten oder durch einen anderen Mechanismus, ausgelöst

werden. Isolierte Neurospora-Nitratreduktase ist zumindest in vitro durch Blaulicht reaktivierbar (Roldán und Butler 1980; Fritz und Ninnemann 1985). Die vorliegenden Versuche sollten klären, ob dieser Photoreaktivierungsprozeß auch in vivo im Mycel eine Rolle spielen könnte.

In Versuchen mit einem Flüssigsystem (Belichtung von Submersmycel im Anzuchtkolben auf der Schüttelmaschine) hatten die Ergebnisse bei den durch Belichtung erzielten Reaktivierungen stark variiert (Ninnemann und Dussa, pers. Mitteilung). Ich versuchte, ein System für Belichtungsexperimente an abfiltriertem, nicht in Submerskultur vorliegendem Versuchsmaterial zu entwickeln.

Um Schwankungen durch Inhomogenität des Versuchsmaterials oder Variationen bei der Probenaufarbeitung auszuschließen, wurden mögliche kritische Parameter in einer Reihe von Vorversuchen untersucht.

E 3.1. Einfluß der Sterilisationsbedingungen des Mediums auf die NR-Ausgangsaktivität

Bedingt durch unterschiedliche Autoklavierbedingungen (vollautomatisch über Zeitschaltuhr, per Hand geschaltet, Abluftventil mehr oder minder stark geöffnet) an den verschiedenen im Institut vorhandenen Autoklavenmodellen trat im Medium eine mehr oder minder starke, auch äußerlich durch eine gelbliche bis bräunliche Verfärbung des Mediums sichtbare Karamelisierung der als C-Quelle dienenden Glucose ein. Der Einfluß des Karamelisierungsgrades auf Wachstumsverhalten und NR-Aktivität wurde in parallel angezogenen Kulturen überprüft. Dabei zeigte es sich, daß die Ausbeute an Zellmaterial bei Anzucht in stark karamelisiertem Medium eher größer war als in der farblosen Kon-

trolle (1,62 gegenüber 1,42g Naßgewicht, dieses Verhalten wurde in mehreren Versuchen beobachtet), die spezifische Aktivität der Nitratreduktase (NR) jedoch durch die Veränderung der C-Quelle (und möglicherweise anderer Komponenten des Mediums) nicht beeinflußt wurde (Tab. 14).

	Naßgewicht (gramm)	NR-Aktivität (Units/mg) Ges.-Akt.	MVH-Akt.
Kontrollmedium	1,42	263	72
Karam. Medium	1,62	261	70

Tab. 14: N. crassa al-2 bd wurde in je zwei Kolben auf schonend autoklaviertem (Kontroll-) und karamelisiertem Nitratmedium für 17h angezogen. Die beiden jeweils zusammengehörigen Kolben wurden vereinigt und Gewicht und Nitratreduktase-Aktivität des Mycels bestimmt. Gesamt-Aktivität: NADPH - NO_3^-; MVH-Aktivität: MVH - NO_3^-. Eine Unit entspricht 1 nmol Nitrit gebildet pro 10min Reaktionszeit bei 30^0C.

E 3.2. Glucoseverbrauch

Eine mögliche Erklärung für die schwankenden Ausgangsaktivitäten des Mycels bot die Hypothese, daß in kräftiger wachsenden Kulturen nach 16-18h bereits ein Übergang in die stationäre Phase, bedingt durch eine Limitierung der C-Quelle speziell in karamelisiertem Medium, stattgefunden haben könnte. Daher wurde die Abnahme der Glucosekonzentration direkt im Medium unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Zusätzlich zum bisher verwendeten Medium mit 1% Glucose wurde dabei auch Nitratmedium mit 2% Glucose angesetzt, um die Konzentration der C-Quelle an die ursprünglich im Vogel's Minimalmedium verwendete (2% Saccharose) anzugleichen.

Obwohl bei beiden verwendeten Glucosekonzentrationen durch den Autoklaviervorgang unter karamelisierenden Bedingungen ca. 10% der durch den enzymatischen Test nachweisbaren Glucose abgebaut wurden, betrug die niedrigste gemessene Glucosekonzentration nach 21,5h Anzucht (im karamelisierten Medium mit 1% Glucose) noch 64% des Ausgangswertes (Tab. 15).

	1% Glucose		2% Glucose	
	nicht kar.	karam.	nicht kar.	karam.
Medium frisch angesetzt	100		100	
Nach Autoklavieren	100 ± 1	89 ± 0	100 ± 2	92 ± 2
Mycel 17,5h gewachsen	84 ± 0	74 ± 0	93 ± 2	84 ± 0
Mycel 21,5h gewachsen	79 ± 5	64 ± 1	84 ± 1	78 ± 1

Tab. 15: Abnahme der Glucose-Ausgangskonzentration in Medium mit 1 bzw. 2% Glucose. Von je 4 Kolben Nitratmedium mit 1% bzw. 2% Glucose wurden jeweils zwei unter schonenden bzw. karamelisierenden Bedingungen autoklaviert. Alle 8 Kolben wurden mit al-2 bd-Conidien angeimpft. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Glucosekonzentrationen bestimmt. Die Zahlen repräsentieren die Mittelwerte der zwei jeweils parallel behandelten Kolben. Die Glucosekonzentrationen sind in % der jeweiligen Ausgangskonzentration (1 bzw. 2% Glucose) angegeben.

Die zusätzlich in Medium mit 1 und 2% Glucose (sterilisiert unter nicht karamelisierenden Bedingungen) gemessenen Glucoseverbrauchskurven zeigten, daß die vorhandene Glucose unter unseren Anzuchtbedingungen erst nach 31 bzw. 40h vollständig verbraucht war. Die nach 48h gemessenen Endausbeuten betrugen für 1% Glucose 2,7 u. 3,35g und für 2% Glucose 4,45 u. 4,75g Naßgewicht pro Kolben (Fig. 10).

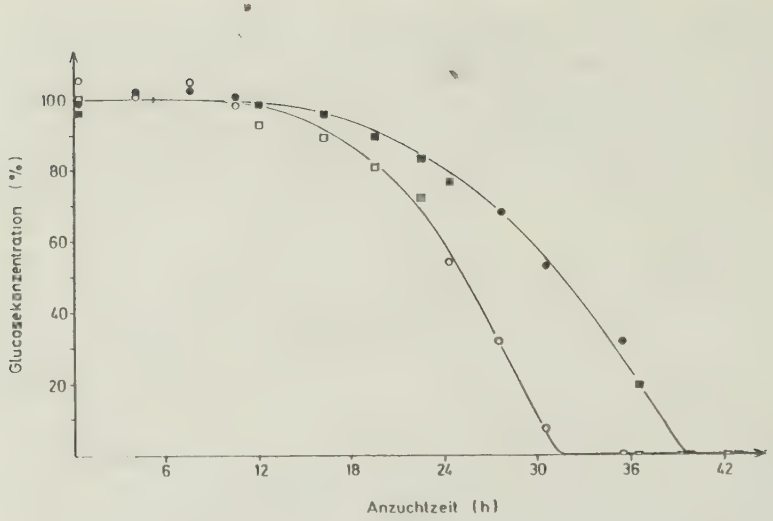

Fig. 10: Glucoseverbrauch von N. crassa al-2 bd bei der Anzucht. Je zwei Anzuchtkolben enthielten Nitratmedium mit 1% (□,○) bzw 2% (■,●) Glucose. Die beiden zu einer Charge gehörenden Kolben wurden jeweils um 12h zeitlich versetzt angeimpft. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben steril entnommen. Das Mycel wurde abfiltriert und die Glucosekonzentration im Medium bestimmt.

Der Verbrauch des im Medium vorhandenen Nitrats durch das wachsende Mycel wurde ebenfalls gemessen. Unter den in den Reihenversuchen verwendeten Anzuchtbedingungen (Anzuchtzeit kleiner als 20h) nahm die Nitratkonzentration im Medium um weniger als 10% ab (Ninnemann, unveröffentlicht).

E 3.3. Standardisierung des Inoculums

Um die durch Güte oder Alter der zum Animpfen verwendeten Conidiensuspension verursachten Schwankungen zu vermeiden, sollten alle Versuche mit weitgehend identischem Material

durchgeführt werden. Das machte den Übergang zu tiefgefrorenen Conidien notwendig. Beim Tieffrieren in flüssigem N_2 verringerten sich die mit diesen Conidien erzielten Ausbeuten an Zellmaterial erheblich. Offenbar büßte ein Teil der Conidien beim Einfrieren seine Keimfähigkeit ein. Der Zusatz von Glycerin (bis zu 50%) zur Conidiensuspension bewirkte eher eine Verringerung der Ausbeute (Tab. 16).

Glyceringehalt der Conidiensuspension	Mycelausbeute mg Naßgew./Kolben	
	RT	-196°C
Kein Glycerin	800	200
20% "	970	110
30% "	800	100
40% "	770	110
50% "	1300	90;130

Tab. 16: Einfluß von Glycerin auf die Verringerung der Keimfähigkeit beim Einfrieren. Je 1,2ml einer sterilen Conidiensuspension wurden mit Glycerin auf die angegebenen Endkonzentrationen eingestellt. Ein Teil der Proben wurde für 10min in flüssigem N_2 eingefroren, der andere Teil bei Raumtemperatur belassen. Die Conidienproben aus beiden Temperaturbereichen wurden für 18h auf NO_3^--Medium angezogen und das Naßgewicht bestimmt.

Die später für die Belichtungsversuche verwendete Conidiensuspension (2,87 x 10^8 Zellen/ml) wurde daher ohne Zusatz von Glycerin in 2- und 4ml-Aliquots bei -196°C schockgefroren und verblieb bis zum Versuch in flüssigem Stickstoff.

E 3.4. Enzymextraktion

Die in den bisherigen Versuchen beobachteten starken Schwankungen in der NR-Aktivität des Mycelhomogenats von Versuch zu Versuch hätten auch auf Einflüsse während der

Aufarbeitung, z. B. unterschiedliche Erwärmung im Potter-Elvehjem-Homogenisator je nach Konsistenz der Probe, zurückzuführen sein können. Der Entschluß, wegen der schlechten Standardisierbarkeit auf den ersten Schritt der kombinierten Aufschlußmethode (ca. 10 maschinelle Durchgänge im Potter-Homogenisator, anschließend 4 x 15sec Ultraschallbehandlung mit Intensität 4) zu verzichten, machte einen Übergang zu höherer Schallintensität (höchste Leistungsstufe des verwendeten Mikrorüssels: 7) notwendig. Die damit verbundene starke Erwärmung sowie das Aufschäumen

		mg Prot. Probe	NR-Akt. (Units/mg) Ges.-Akt.	MVH-Akt.
10 x pottern, gefolgt von 4x15sec US St. 4	gekühlt	44,4	263	72
	ungekühlt	35,2	222	352*
US 4x15sec Stufe 7	gekühlt	50,0	238	66
" 8x15sec "	"	47,0	233	68
" 12x15sec "	"	51,0	228	66

Tab. 17: Nitratreduktase-Aktivität unter verschiedenen Extraktionsbedingungen. Al-2 bd-Mycel wurde für 17h angezogen und in drei Teile von je 0,42g geteilt. Zwei Portionen wurden in je 4ml 100mM KPi pH 7,2 aufgenommen und entweder ohne oder mit Kühlung dem zweistufigen Aufschluß mit Potter-Homogenisator und Ultraschall unterworfen, ein Teil wurde in 10ml Puffer aufgenommen und lediglich beschallt. Von dieser Probe wurde nach 4 x 15sec und 8 x 15sec Behandlung je 1ml zur späteren Messung entnommen. Auf alle Ultraschallbehandlungen (US) von 15sec Dauer folgte eine gleich lange Pause. Die Proben wurden 20min bei 20 000g zentrifugiert und die Aktivitäten bzw. Protein in den Überständen gemessen. * Der Anstieg der terminalen Aktivität wurde in zwei Versuchen beobachtet.

der Probe konnten durch die Verwendung eines dreiarmigen Spezialbeschallungsgefäßes und ein größeres Probenvolumen ausgeglichen werden. Ein Vergleich zeigte, daß:

1) nicht-ausreichende Kühlung während des Aufschlusses zu einem überproportional starken Anstieg der terminalen ($MVH\text{-}NO_3^-$) Aktivität der Nitratreduktase führte. In einem Parallelversuch (Daten hier nicht gezeigt) fiel dabei gleichzeitig die Gesamtaktivität auf etwa 20% des (gekühlten) Kontrollwertes;
2) auch ohne den vorgeschalteten Potter-Schritt nach 4 x 15sec Ultraschallbehandlung mit Stufe 7 das Mycel, gemessen an Proteinausbeute und NR-Aktivitäten, effektiv homogenisiert worden war;
3) die Ausbeute durch weitere Ultraschallbehandlungen nicht erhöht wurde (Tab 17).

Die Versuche hatten gezeigt, daß einerseits allein durch die Ultraschallbehandlung mit hoher Intensität die Probe wirkungsvoll aufgeschlossen werden konnte, andererseits die dabei auftretende stärkere Erwärmung möglicherweise berücksichtigt werden mußte. In einem weiteren Versuch wurde daher die Erwärmung der Probe beim Aufschluß mit Stufe 7 im Beschallungsgefäß direkt gemessen. Nach 4 x 15 sec Behandlung betrug die Temperatur der Probe bei Kühlung mit Eiswasser 23-25°C, bei Kühlung mit 11°C warmem Wasser 29°C. Die in den jeweils drei parallelen Proben gemessenen Werte für Gesamt- bzw. MVH-Aktivität waren vergleichbar. Behandlung ohne Kühlung der Probe führte zu einer Erwärmung auf 63°C, danach war keine NR-Aktivität mehr meßbar (Daten nicht gezeigt). Mögliche geringfügige Temperaturunterschiede von 1-2°C zwischen den einzelnen Proben während des Aufschlusses, die durch einen mehr oder minder großen Eisanteil des Eiswasserbades hervorgerufen werden könnten, liegen damit innerhalb des Sicherheitsspielraumes.

E 3.5. Nitratreduktase-Aktivitätstests

Bei einer Überprüfung der Nitratreduktase-Tests für Gesamt- und MVH-Aktivität nach Garrett und Nason (1969) fand ich zwei potentielle Fehlerquellen in dieser Methode: Im Test auf terminale Aktivität ist die Farbausbeute bei einer gegebenen Nitritkonzentration von der zwischen der Zugabe beider Farbreagenzien verstrichenen Zeitspanne abhängig. Ein Zeitintervall von 150sec zwischen der Zugabe der beiden Reagentien führt gegenüber der Kontrolle (beide Reagentien mit ca. 1sec Abstand zugegeben) zu einer um 20-25% verminderten Farbintensität. Der Farbverlust erreicht bei 10minütigem Intervall 70%.

Das im Test auf Gesamtaktivität als Substrat eingesetzte NADPH interferiert gleichfalls mit der Ausbildung des Farbkomplexes in der Nitritnachweisreaktion.

Die in den Belichtungsversuchen angewendete modifizierte Meßmethode ist in M 5.5 beschrieben. Für den Test auf Gesamt- (NADPH-NO_3^-) Aktivität wurde eine aus 1,5mM PMS und 4mM Ferricyanid bestehende Oxidationsmischung entwickelt. Durch Zugabe von 50µl dieses "Stopmix" zum Testansatz wird innerhalb von 15sec das gesamte im Test eingesetzte NADPH oxidiert. Das Reagenz vereinigt so zwei Funktionen in einem Schritt: 1) Die Beendigung der Enzymreaktion durch raschen Entzug des Substrates und 2) die Entfernung von überschüssigem NADPH aus dem Testansatz.

Die Methode wurde mit der von Garrett und Nason (Stoppen der Reaktion durch Zugabe von Wasser und dem ersten Farbnachweisreagenz, keine Nachbehandlung zur Entfernung des überschüssigen NADPH) in einem Parallelversuch verglichen. Die Proben, in denen die enzymatische Reaktion durch Zugabe von "Stopmix" beendet worden war, zeigten bis zur einer E_{540} von ca. 0,7 eine lineare Zunahme des Nitrit-Azofarbkomplexes mit der Zeit. In den parallel

durch Zugabe von Wasser und Farbreagenz gestoppten Proben wurde durch nicht verbrauchtes NADPH die Farbausbeute und damit die errechnete spezifische Aktivität der Probe um bis zu 50% verringert (Fig. 11). Diese Ergebnisse sind an anderer Stelle ausführlich beschrieben worden (Scheideler und Ninnemann 1986).

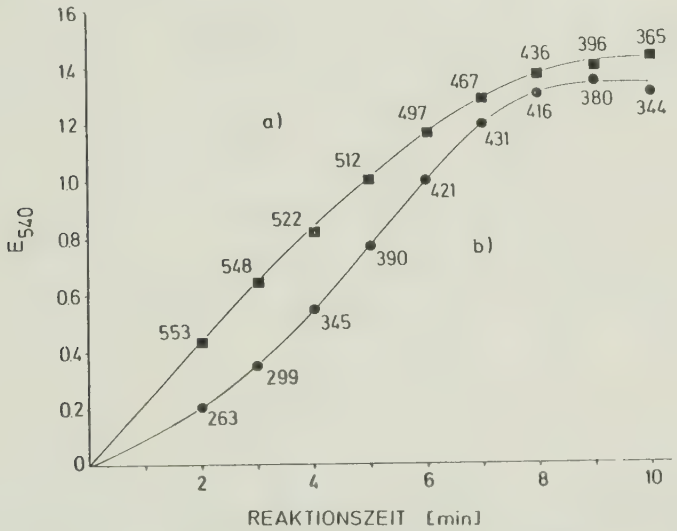

Fig. 11: Beeinträchtigung der Nitritnachweisreaktion durch nicht verbrauchtes Substrat beim Test auf Gesamtaktivität der NR. Die Proben enthielten 410µl Testmix (siehe M 5.5.), 40µl NADPH 2mM und 50µl Enzym (4,1mg/ml). Zu den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion entweder a) durch Zugabe von 50µl "Stopmix" oder b) Zugabe von 0.5ml Sulfanilamidreagenz und 0,9ml aqua dest. beendet. Nach Beendigung der Reaktion in allen Proben (d. h. nach 10min.) wurden die nach Methode a) gestoppten Proben ebenfalls mit 0,5ml Sulfanilamidreagenz sowie mit 0,85ml aqua dest. versetzt. Anschließend wurde in allen Proben der Farbkomplex durch Zugabe von 0,5ml Kopplungsreagenz (siehe M 5.5.) entwickelt. Die Zahlen geben die aus der Absorption bei 540nm errechnete spezifische Aktivität der Proben in Units/mg Protein an.

E 3.6. Stabilität des Enzyms beim Einfrieren der Mycelprobe und im Rohextrakt

Die Durchführung der Belichtungsexperimente als Reihenversuche (siehe E 3.7), teils mit eng gestaffelten Belichtungszeiten (30min), teils über längere Zeiträume (12h), machte, um die Proben parallel aufarbeiten und messen zu können, das Einfrieren der Mycelstücke notwendig. Der Einfriervorgang hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der NR (Tab. 18, Spalte 1). Nach dem Aufschluß blieb die Aktivität im 20 000g-Überstand über Stunden konstant. Die Einzelwerte in den verschiedenen Folgemessungen zeigten jeweils die gleiche Abweichungstendenz, es ist daher in jedem Falle sinnvoll, die zu einem Versuch gehörenden Proben zusammen zu vermessen (Tab. 18, Spalten 2-5).

	Ges.-Akt. (Units/mg)	Akt. in % der ersten Messung t_0	+1h	+1,5h	+9h
Proben eingefroren	799	100	107	91	101
	830	100	107	91	101
Proben bei RT.	735	100	104	88	99
	842	100	102	92	99

Tab. 18: Stabilität von NR beim Einfrieren des Mycels und im Rohextrakt nach dem Aufschluß. Vier Mycelproben eines 18h angezogenen Mycels wurden in Aluminiumfolie verpackt. Jeweils zwei wurden für ca. 2min in flüssigem N_2 eingefroren, die anderen blieben bei Raumtemperatur (RT). NR wurde extrahiert und vermessen wie beschrieben (M 5.4-5.5). Die unmittelbar nach dem Aufschluß (t_0) gemessene spezifische Aktivität (1. Spalte) wurde gleich 100% gesetzt. Die bei der Wiederholung der Messung nach 1; 1,5 und 9h ermittelten Aktivitäten sind auf diesen Wert bezogen. Die Proben standen im Extraktionspuffer auf Eis.

Um Abweichungen zwischen den einzelnen in sich konsistenten Meßreihen möglichst zu vermeiden, wurde die Temperatur-Äquilibrierung der Testansätze auf 30°C im Wasserbad mit dem Thermofühler überwacht. Ferner wurde darauf geachtet, möglichst alle Versuchsparameter zu standardisieren. So steigerte z. B. ein Zeitraum von 20min zwischen der Zugabe des Enzyms zum vorgelegten, auf 30°C temperierten Reagenzmix und dem Start der Reaktion durch Zugabe von NADPH die Enzymaktivität in vier Proben im Mittel um 8% (Tab. 19).

	Ges.-Akt. (Units/mg) Probe Nr.			
	1	2	3	4
NADPH 1min nach Enzym zugegeben	726	757	645	778
" 20min " " "	764	821	706	861
	+5%	+8%	+9%	+11%

Tab. 19: Einfluß von Testparametern auf die gemessene Enzymaktivität. Nach dem Temperieren der Testansätze (0,41ml) auf 30°C im Wasserbad wurden alle Ansätze mit Enzym versetzt. Die Reaktion wurde nach 1 bzw. 20min durch Zugabe von NADPH gestartet. Dabei wurde auf gleiche Temperatur in beiden Chargen geachtet.

E 3.7. Belichtungsexperimente

Die bisher durchgeführten Vorversuche sollten dazu dienen, bei den Belichtungsexperimenten eine größtmögliche Reproduzierbarkeit zu erzielen. Auf der Basis der in diesen Versuchen gewonnenen Erkenntnisse wurde das Versuchssystem für die Belichtungsreihen entwickelt:

Die Conidien von Neurospora crassa al-2 bd (Dichte 2,87 x 10^8 Conidien/ml) wurden unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer in 2- und 4ml-Portionen steril abgefüllt, in flüssigem N_2 eingefroren und aufbewahrt (E 3.3). Alle Reaktivierungsversuche wurden mit Zellmaterial durchgeführt, das von Conidien aus dieser tiefgefrorenen Suspension stammte.

Die Anzucht erfolgte auf Nitratmedium mit 50mM Nitrat und 1% Glucose, schonend autoklaviert (E 3.1,2). Die autoklavierten Kolben wurden im Kühlraum aufbewahrt. Es wurden jeweils 6-8 Reihen mit einer Charge Medium durchgeführt. Für einen Versuch wurden jeweils zwei Kolben mit je 2ml Conidiensuspension angeimpft und für 18-19h bei 80Upm im Dunkeln angezogen. Ernte und Aufarbeitung der Zellen sind in M 5.1 beschrieben. Die anschließende Hungerbehandlung des Mycels wurde unter den in M 5.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Die Belichtungsexperimente wurden mit zwei verschiedenen Lichtquellen durchgeführt: Einer handelsüblichen 300W-Reflektorglühbirne (Osram Comptalux) und einer präfokussierten 1000W-Xenonlampe (Varian-Eimac). Die Bestrahlung der Proben erfolgte senkrecht von oben. Das Licht der Lampen wurde durch eine 1,5cm dicke Schicht aus 15%iger Kupfersulfatlösung gefiltert. Die Comptalux erreichte, in meiner Beleuchtungsanordnung (M 5.3) am Ort der Probe gemessen, eine Lichtintensität von $28W/m^2$, während mit der Xenonlampe $500W/m^2$ erreicht wurden.

In Reihenversuchen mit verschiedenen Hungerzeiten wurde die Effektivität verschiedener Belichtungsprogramme (Comptalux 5, 20 und 40min, Eimac-Lampe 5 und 20min) jeweils paarweise miteinander verglichen. Die besten Ergebnisse wurden bei einer 20minütigen Belichtung mit

28W/m^2 erzielt. Alle im Folgenden aufgeführten Versuche sind mit diesen Standardbelichtungsbedingungen durchgeführt worden (M 5.3).

Zunächst wurden in verschiedenen Versuchsreihen die Hungerzeiten des Mycels zwischen 2 und 24 Stunden variiert. Die Auswertung dieser Experimente zeigte, daß die Reaktivierbarkeit der Nitratreduktase im Mycel offenbar dann am größten war, wenn die NR-Aktivität der Zellen auf etwa die Hälfte bis ein Drittel der Ausgangsaktivität gesunken war. Dieser Zustand stellte sich im Mycel unter meinen experimentellen Bedingungen etwa 8 bis 12 Stunden nach Einsetzen der Substratmangelbedingungen ein. Fig. 12 zeigt die Abnahme der Nitratreduktaseaktivität mit fortschreitender Hungerzeit. Die Daten von drei Versuchsreihen wurden in einer Abbildung zusammengefaßt. Die Gesamtaktivität (NADPH-NO_3^-) sinkt unter Substratmangelbedingungen und hat nach etwa 11 bis 17 Stunden den Nullpunkt erreicht; die terminale (MVH-NO_3^-) Aktivität des Enzyms bleibt dagegen nach einer anfänglichen Steigerung im weiteren Verlauf des Experiments konstant.

Zwischen den einzelnen Versuchen zeigten sich bezüglich der nach einer gegebenen Hungerzeit noch vorhandenen Aktivität starke Unterschiede. So zeigte Mycel, das an zwei aufeinander folgenden Tagen unter möglichst identischen Bedingungen (gleiches Medium, Anzuchtzeit usw.) angezogen und geerntet wurde, einmal nach 8,5h Anzuchtzeit noch eine NR-Aktivität von 600 Units/mg, die auch nach 11,5h erst auf 400 Units gefallen war, während im anderen Fall schon nach 8h nur noch 150 und nach 9h weniger als 100 Units/mg gemessen wurden. Es war nicht möglich, mit Sicherheit den genauen Zeitpunkt nach dem Einsetzen der Hungerbedingungen vorauszuberechnen, an dem im Mycel die besten Bedingungen für

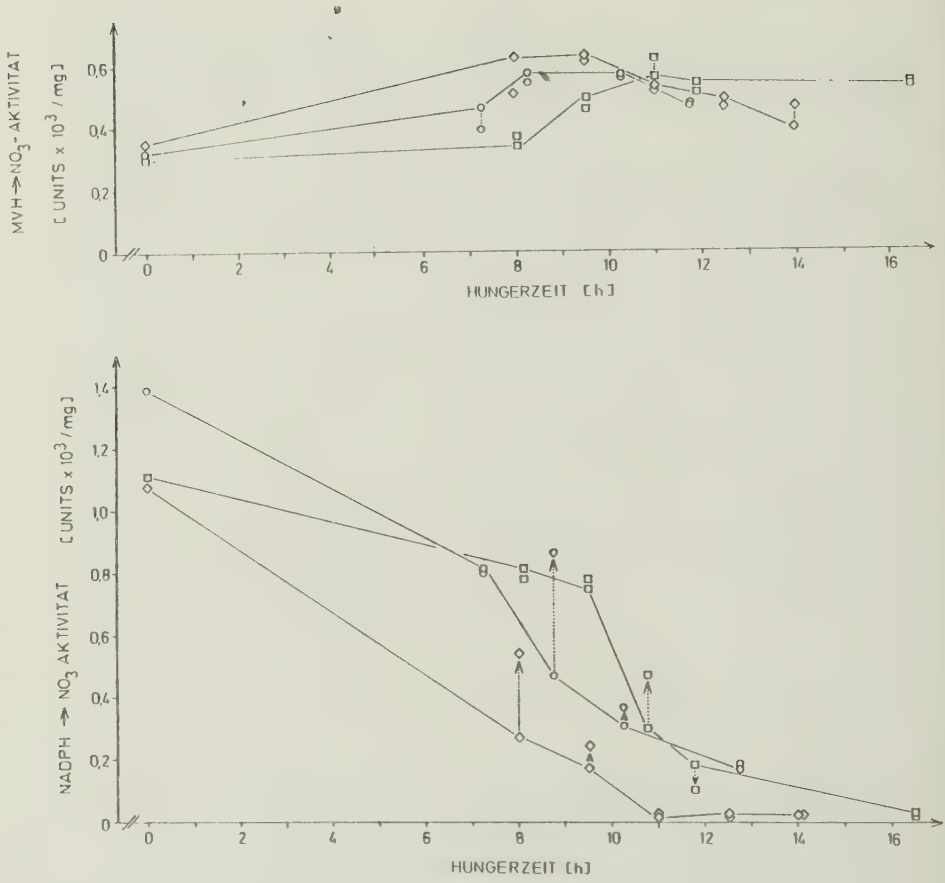

Fig. 12: Terminale Aktivität ($MVH\text{-}NO_3^-$; oben) und Gesamtaktivität ($NADPH\text{-}NO_3^-$; unten) der Nitratreduktase im Mycel in Abhängigkeit von der Hungerzeit und Reaktivierung der Gesamtaktivität durch Licht. Zu den angegebenen Hungerzeiten wurden jeweils zwei Mycelproben von Neurospora crassa al-2 bd aufgearbeitet. Während eine Probe für 20min mit 28 W/m^2 belichtet wurde, lag die Dunkelkontrolle unter einer lichtdichten Abdeckung (M 1. 2. und M 5.1.-M 5.5). In der Abbildung sind die Daten von drei Versuchstagen (Kreise, Quadrate und Rauten) zusammengefaßt. Die jeweils zu einem Reihenversuch gehörenden Dunkelkontrollen sind durch Linien verbunden.

eine Reaktivierung der (physiologischen) NR-Gesamtaktivität herrschen würden. Daher mußten alle Experimente in Form von Zeitreihen durchgeführt werden.

Bei der Auswertung der Daten schien das verbindlichere Kriterium für den physiologischen Hungerzustand des Mycels und damit die Reaktivierbarkeit der Nitratreduktase eher die zum Zeitpunkt der Belichtung noch vorhandene Restaktivität als die unter Hungerbedingungen verbrachte absolute Zeit zu sein. Die nach verschiedenen Hungerzeiten in der belichteten Probe und der zugehörigen Dunkelkontrolle gemessenen Aktivitäten wurden daher auf die jeweilige Ausgangsaktivität bezogen.

Zur statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse zunächst nach abnehmender Restaktivität geordnet, in 10%-Gruppen unterteilt und anschließend Mittelwerte und Standardabweichungen jeder Datengruppe bestimmt. Die zwischen den belichteten Proben und den Dunkelkontrollen gefundenen Unterschiede wurden mit dem Peritz' F-Test (Harper 1984) auf ihre statistische Signifikanz untersucht (Tab. 2o u. 21).

Dunkelkontrollen

Die Erwärmung der Proben während der Belichtung für 20min mit 28W/m^2 betrug 3^{o}C. Es wurden Belichtungsreihen mit zwei verschiedenen Arten von Dunkelkontrollen durchgeführt: Die Kontrolle wurde entweder, bereits in Alufolie verpackt, während der Belichtung unter einer lichtdichten Abdeckung aufbewahrt (Tab. 2o) oder lag zusammen mit der zu belichtenden Probe unter der Lampe (Tab. 21). In diesem Falle stieg die Temperatur in der Dunkelkontrolle um 1-2^{o}C. Die Temperatur der Proben wurde mit einem Kupfer-Konstantan-Thermofühler unmittelbar auf der Myceloberfläche bestimmt (Modell AN 2572; Analogic Inc.; Wakefield; USA).

NR-Restakt. in % der Ausgangsakt.				NR-Restakt. in % der Ausgangsakt.			
D	L	MW D / MW L	Unterschied signif. mit	D	L	MW D / MW L	Unterschied signif. mit
91	93			36	35	33 ± 3	
90	94			34	62	47 ± 14	82%
				30	43		
88	84						
80	86			29	37		
				27	42		
74	72			27	29		
73	71	73 ± 1		25	50	23 ± 4	
72	78	71 ± 7	45%	22	27	30 ± 10	92%
72	61			20	21		
				20	23		
69	84			20	19		
69	65			20	25		
67	69						
67	72	65 ± 3		18	16		
65	72	69 ± 7	86%	18	9		
65	67			16	23		
63	70			16	21		
63	62			16	9		
61	62			15	46		
				14	20	14 ± 2	
59	58			14	13	16 ± 10	64%
59	54			13	10		
58	60	54 ± 4		13	13		
53	64	60 ± 7	90%	12	17		
52	54			12	7		
50	74			11	26		
50	56			11	9		
				10	6		
48	56						
45	44	44 ± 4					
43	27	40 ± 11	48%				
41	31						
40	42						

Tab. 2o: Zusammenfassung von Daten über die Photoreaktivierung der NR-Gesamtaktivität unter Standardbelichtungsbedingungen (siehe M. 5.3.) aus verschiedenen Versuchsreihen, bei denen die Dunkelkontrollen während der Belichtung der Probe unter einer lichtdichten Abdeckung aufbewahrt wurden. Um den physiologischen (Hunger-) Zustand des Mycels in den verschiedenen Proben vergleichen zu können, wurde die zum Zeitpunkt der Belichtung gemessene Aktivität auf die jeweilige Ausgangsaktivität des Mycels vor dem Einsetzen der Substratmangelbedingungen bezogen. Die Daten wurden in 10%-Schritten in Gruppen aufgeteilt und ausgewertet. D: Dunkelkontrollen; L: belichtete Proben; MW D (L): Mittelwert aller D (L) in dieser %-Gruppe.

NR-Restakt. in % der Ausgangsakt.			
D	L	MW D MW L	Unterschied signif. mit
72	74		
65	72		
65	59	65 ± 1	
64	43	58 ± 15	53%
58	63		
55	66	54 ± 3	
52	49	53 ± 14	8%
51	35		
49	57		
48	56		
45	49	44 ± 4	
42	56	51 ± 7	95%
42	51		
40	39		

NR-Restakt. in % der Ausgangsakt.			
D	L	MW D MW L	Unterschied signif. mit
39	43		
38	21	36 ± 4	
37	53	34 ± 16	18%
31	20		
27	26		
25	16		
23	23	23 ± 2	
23	27	18 ± 9	80%
22	4		
20	13		
17	19		
15	10		
12	10		
11	15	12 ± 3	
11	10	12 ± 4	12%
10	13		
10	8		
10	9		

Tab. 21: Zusammenfassung von Daten über die Photoreaktivierung der NR-Gesamtaktivität unter Standardbelichtungsbedingungen aus verschiedenen Versuchsreihen. Die Dunkelkontrollen lagen während der Belichtung, in Aluminiumfolie eingeschlagen, zusammen mit der Probe unter der Lampe. Auswertung s. Tab. 18.

Diejenigen Datengruppen der Tabellen 2o und 21, bei denen eine statistische Signifikanz der Photoreaktivierung von mehr als 89% erreicht wurde, sind in Tab. 22 zusammengefaßt. Die besten Bedingungen für eine Photoreaktivierung liegen offenbar dann vor, wenn die Nitratreduktase-Restaktivität im Mycel noch etwa 20-50% der vor dem Einsetzen der Hungerbedingungen gemessenen Ausgangsaktivität beträgt.

	Gruppe	MW D MW L	Unterschied signif. mit
Kontr. unter Abdeckung	50-60%	54 ± 4 60 ± 7	90%
"	20-30%	23 ± 4 30 ± 10	92%
Kontr. unter Lampe	40-50%	44 ± 4 51 ± 7	95%

Tab. 22: Reaktivierung der NR-Gesamtaktivität. Zusammenfassung aller Datengruppen aus den Tabellen 2o und 21, die eine statistische Signifikanz von mehr als 89% aufweisen.

DISKUSSION

D 1. Flavinversuche

Um eine mögliche Beteiligung freier Flavine am Photorezeptionsprozeß in Neurospora diskutieren zu können, mußte zunächst die Existenz dieser Flavine in den Zellen nachgewiesen werden. Es sollte ein System entwickelt werden, das die Untersuchung und Identifizierung solcher Flavine ermöglichte.

Die Hauptschwierigkeit lag darin, die artifizielle Freisetzung ursprünglich proteingebundener Flavine während der Probenaufarbeitung zu vermeiden. Daher wurden die Versuche an der zellwandlosen Mutante "slime" durchgeführt, deren einzeln wachsende Sphäroplasten (Emerson 1963) im Gegensatz zum Mycel des Wildtyps schonend durch osmotischen Schock aufgebrochen werden können.

Die Identifizierung der in den Zellen der Neurospora-Mutante "slime" enthaltenen Flavine erfolgte mit dünnschichtchromatographischen Methoden. Nach einem Phenolkonzentrierungsschritt konnten mit dieser Technik die Anteile von Riboflavin, FMN und FAD am Gesamtflavin bestimmt werden (Scheideler 1980). Bei der Durchführung der Flavinanreicherung mittels Phenol (M 2.2.) wurden die Proben mit Ammonsulfat gesättigt. Durch die dabei an den Flavoproteinen auftretenden Konformationsänderungen können nicht kovalent gebundene bzw. lose assoziiert vorliegende Flavine teilweise freigesetzt werden, daher mußten zuvor die freien Flavine möglichst schonend von den Proteinen getrennt werden. Durch den Gelfiltrationsschritt (E 1.1.) konnte eine vollständige Trennung der beiden Fraktionen erzielt werden.

Bei der Flavinbestimmung wurde in den Zellen stets ein unerwartet niedriger Anteil an FAD, selbst in der Proteinfraktion, gefunden. Da der weitaus größte Teil der zellulären Flavoenzyme das Dinucleotid als prostethische Gruppe enthält, überprüfte ich diesen Befund mit externen FAD-Standards, die während der Aufarbeitung zugegeben wurden. Die Tatsache, daß nach der Lyse der Zellen FAD im Homogenat selbst bei niedriger Temperatur in kürzester Zeit in FMN bzw. Riboflavin abgebaut wurde (Scheideler et al. 1984), machte eine Modifikation der Bedingungen während der Aufarbeitung nötig.

Um den FAD-Abbau durch die auch bei 0-4°C sehr aktive Nucleotid-Pyrophosphatase von Neurospora zu verhindern, wurde ein spezielles Puffersystem entwickelt. Durch die Kombination der in E 1.1. beschriebenen Maßnahmen wie Verschieben des pH, Zugabe von Komplexbildnern, Phosphat und ATP war es möglich, das Enzym spezifisch zu hemmen und die Umwandlung von FAD zu unterbinden.

Bei der Aufarbeitung von Kulturen verschiedenen Alters unter diesen für die Aktivität der Pyrophosphatase restriktiven Bedingungen zeigten sich keine Unterschiede im Gehalt bzw. der Zusammensetzung der freien Flavine in Abhängigkeit vom Kulturalter. Die in früheren Reihenversuchen (Scheideler 1980) im Kulturmedium bzw. den Zellen beobachtete Verschiebung der Anteile der einzelnen Flavine am Gesamtflavin mit steigendem Kulturalter ist nach jetzigen Erkenntnissen ein durch unterschiedliche Enzymaktivität hervorgerufener Artefakt und spiegelt nicht eine Veränderung der tatsächlichen Flavinzusammensetzung in vivo wieder.

Die Säulentrennung im Citrat-Phosphat-Puffersystem bietet die Möglichkeit, bei geringstmöglicher artifizieller Freisetzung proteingebundener Flavine und ohne Beeinflussung

durch die FAD-Abbaureaktion die Zusammensetzung der freien Flavine von Neurospora crassa "slime" in vivo zu untersuchen.

Beim Versuch, das für die "slime"-Mutante entwickelte System bei der Untersuchung der Flavinzusammensetzung anderer Stämme, z. B. der Albinomutante al-2 bd, einzusetzen, war zu bedenken, daß die groben Homogenisationsmethoden mit Dynomühle oder Ultraschall, die für die Aufarbeitung dieses Mycels notwendig waren, leicht zu einer artifiziellen Freisetzung von ursprünglich proteingebundenen Flavinen führen und damit keine eindeutigen Ergebnisse über in vivo freie Flavine liefern könnten. Versuche, dieses Problem durch die Herstellung von Protoplasten zu umgehen, zeigten sofort die Schwierigkeit, genügende Ausbeuten an Zellen für biochemische Messungen aus diesem Verdauungsansatz zu gewinnen.

Weiterführende Untersuchungen bei Neurospora mit der Mutante al-2 bd wären durch den Einsatz eines von Brooks et al. 1983 speziell für Neurospora entwickelten Verdauungsansatzes möglich. Die Einstandskosten für das Arbeiten mit diesem aus mehreren Enzymen und Antibiotika bestehenden System liegen jedoch hoch.

(Freie) Flavine als Photorezeptoren für phototrope Krümmungsreaktionen sind bereits 1949 von Galston vorgeschlagen worden. Ausgangspunkt für diese Überlegung war die Beobachtung, daß Sproßabschnitte von Erbsenkeimlingen in Medien, die Indolessigsäure (IES) enthielten, Längenwachstum zeigten und daß weißes Licht a) dieses Wachstum hemmte und b) die Zerstörung von IES im Medium beschleunigte (Galston und Hand 1949). Gleichzeitig wurde die Photooxidation von IES durch Riboflavin in vitro nachgewiesen (Galston 1949).

Galston und Baker untersuchten 1949 verschiedene Abschnitte der Avena-Koleoptile auf ihren Flavingehalt und fanden in allen Proben "Riboflavin im Überschuß". Allerdings konnte bei der angewendeten Extraktionsmethode mit

heißem Wasser (15min autoklavieren) nicht zwischen freiem und gebundenem Flavin unterschieden werden. Ferner wurden, bedingt durch die angewendeten Methoden, die einzelnen Flavinspezies nicht identifiziert.

Zunächst war für die Phototropismus-Reaktion *in vivo* ein Reaktionsmechanismus analog dem *in vitro*-System in Betracht gezogen worden. Die 1951 von Galston und Baker veröffentlichten Ergebnisse wiesen jedoch darauf hin, daß die Beschleunigung der Photooxidation von IES durch Licht in Erbsenkeimhomogenaten nicht, wie ursprünglich angenommen, durch freies Riboflavin, sondern durch ein Flavoprotein hervorgerufen wurde. Dennoch schließt dieser Befund eine Beteiligung freier Flavine am Reaktionsmechanismus anderer phototroper Systeme (und generell bei anderen Photoreaktionen) nicht aus.

Später wurden mit verbesserten Methoden verschiedene Versuche unternommen, die Flavinzusammensetzung phototroper Zellen bzw. Zellverbände wie der *Phycomyces*-Sporangiophore (Wolken 1977) und der *Avena*-Koleoptile (Zenk 1977 a,b) zu untersuchen. Zenk (1967b) fand als Hauptkomponente eine unbekannte Flavinspezies "FX" und schlug als Mechanismus für die Starklichtreaktion der *Avena*-Koleoptile die Photooxidation einer "peripheren, wandständigen Plasmakomponente" durch angeregtes Flavin vor. Hertel et al. (1980) diskutierten eine Photorezeptorfunktion von freiem Riboflavin bzw. der unbekannten Flavinkomponente "FX" durch eine reversible Anlagerung an membranassoziierte Bindungsorte in Mais.

Aufgrund der in den Flavinversuchen bei *Neurospora* gewonnenen Erkenntnisse muß bei allen Untersuchungen sogenannter "freier" Flavine, aber auch bei der Messung der Gesamtflavinverteilung in Geweben, neben der artifiziellen Freisetzung gebundener Flavine bei der Homogenisation des Materials die Möglichkeit des enzymatischen Ab- bzw. Umbaus

einzelner Flavine in Betracht gezogen werden. Literaturaussagen über die Flavinzusammensetzung anderer untersuchter Organismen bedürfen daher möglicherweise einer Überprüfung.

Die hier entwickelten schonenden Methoden zur Lyse und Aufarbeitung der Zellen weisen auf die Existenz freier Flavine in Neurospora hin. Möglicherweise sind solche Flavine an der Lichtsteuerung physiologischer Prozesse in diesem Organismus beteiligt.

D 2. Versuche zur Isolierung von Plasmamembran

Seit der Beschreibung der lichtinduzierten Absorptionsänderungen durch Butler und Mitarbeiter (Poff, Butler und Loomis 1973; Poff und Butler 1974; Munoz und Butler 1975) ist versucht worden, die Bedeutung dieser Reaktion für die Lichtsteuerung zu klären und das potentielle Photorezeptormolekül in der Zelle zu lokalisieren.

Die von Leong et al. (1981 a; b) und Widell et al. (1981; 1982; 1983 a; b) an Mais, Gerste, Hafer und Blumenkohl durchgeführten Versuche zeigen, daß zumindest in der Plasmamembran dieser grünen Pflanzen ein photoreduzierbares Cytochrom vom b-Typ fest gebunden vorliegt. Es existieren jedoch keine Beweise für die physiologische Signifikanz der in den Plasmamembran-Fraktionen dieser Organismen in vitro beobachteten Photoreduktionen.

Brain et al. (1977a) hatten in der Cytochrom b-defizienten Neurospora-Mutante poky-band eine verringerte Sensitivität des Mycels gegenüber Blaulicht festgestellt. Ein Vergleich der hochgereinigten Plasmamembranfraktion dieser Mutante mit der eines photosensitiven Stammes, wie z. B. der Albino-band-Mutante al-2 bd, könnte möglicherweise einen direkten Hinweis darauf erbringen, daß zwischen

der Reduktion genau dieses membrangebundenen b-Typ Cytochroms und der Signalumsetzung bei der Blaulicht-Photorezeption tatsächlich ein Zusammenhang besteht.

Versuche mit der Neurospora-Mutante al-2 bd, die ich zunächst mit der von Leong et al. (1981a) für Mais entwickelten Gradientenmethode durchführte, zeigten bald die Schwierigkeit, die Plasmamembran des Pilzes wirksam von mitochondrialer Kontamination zu befreien. Dabei ist allerdings zu bedenken, daß die Zentrifugationsbedingungen von Leong ausstattungsbedingt nicht genau übernommen werden konnten und die Experimente daher in den Details nicht völlig vergleichbar sind. Das Renografin-Gradientenmaterial, das bei Mais zu einer eindeutigen Trennung von mitochondrialem und Plasmamembran-Material führte, konnte bei den von mir getesteten Zentrifugationsbedingungen die Neurospora-Membranen nicht separieren.

Es ist denkbar, daß das für die Gradienten verwendete deutsche Produkt, Urografin (Schering), entgegen den Auskünften des Herstellers doch nicht dem amerikanischen Renografin adäquat war. Eine andere Möglichkeit schien zu sein, daß bei der Aufarbeitung des sehr harten Neurospora-Mycels in der Glasperlenmühle die Membranen aller in der Zelle enthaltenen Organellen sowie die Plasmamembran zu einer heterogenen Population von kleinen und großen Vesikeln, teilweise noch mit anhängenden Zellwandbruchstücken, zerkleinert werden. Ein solches Gemisch ist mit einem Trennverfahren, das nach Größe bzw. Dichte selektiert, schlecht zu trennen.

Aus diesem Grund wurde versucht, die Plasmamembran mit Hilfe des "Phase Partition"-Verfahrens, das Membranvesikel auf Grund ihrer Oberflächeneigenschaften trennt, zu reinigen.

Bei diesen Versuchen zeigten sich sowohl in dem von mir entwickelten Tris-Citrat-Puffersystem als auch mit den von Widell und Larsson (1981) entwickelten Standardmethoden für die Reinigung der Plasmamembran grüner Pflanzen zwei grundlegende Unterschiede im Verhalten der Pilzmembranen gegenüber diesem Material: Weder wurde Plasmamembran in der Oberphase, noch mitochondriale Membran in der Unterphase in größerem Ausmaß angereichert.

Die "Partition"-Versuche mit dem Phosphat-Puffersystem wurden von mir in Lund exakt nach der von dieser Arbeitsgruppe verwendeten Methode durchgeführt. Durch Modifikationen der Versuchsparameter, die nach den dortigen Erfahrungen eine erfolgreiche Anpassung der Standardtechnik an einen anderen (pflanzlichen) Organismus ermöglichen, konnte die Trennung der Neurospora-Membranen nicht entscheidend verbessert werden. Die Anreicherung der Plasmamembran im Phosphat-Puffersystem nach Widell und Larsson übertraf die im Tris-Citrat-Puffersstem erzielte Reinigung nicht.

Für die Ergebnisse sind verschiedene Erklärungen möglich: Während der Homogenisation des Materials könnten Bruchstücke der verschiedenen Membranen, die sich wieder zu Vesikeln zusammenschließen, Membranen anderen Ursprungs einschließen. Die Markerenzyme der eingeschlossenen Kontaminationen könnten die spezifische Anreicherung der die Vesikel bildenden Membranspezies in einer bestimmten Phase verschleiern. Die anderen Möglichkeiten wären eine relativ ähnliche Affinität der verschiedenen Membranen zu den einzelnen Phasen oder ein generell niedriger Verteilungskoeffizient der Pilzmembranen in den verwendeten PEG/Dextran Phasensystemen.

Die Möglichkeit einer Kreuzkontamination durch eingeschlossene fremde Membranen scheint eher unwahrscheinlich, da in den Versuchen zur Freisetzung der Kontaminationen durch Ultraschall- oder French Press-Behandlung die Tren-

nung nicht verbessert werden konnte. Das Ergebnis des maschinellen Gegenstromlaufs in einem 60-Kammer-Gerät nach Albertson (1971) unterstützt diese Aussage: Wenn zwischen den beiden Phasen der verwendeten Systeme tatsächlich eine Verteilung unterschiedlicher Membranvesikel stattfindet, diese Vesikel jedoch eingeschlossene Fremdmembranen enthalten, könnten die Tests auf verschiedene Membranmarker unter Umständen bei der 2-Schritt-Reinigung keine Anreicherung einer bestimmten Membranspezies in einer der Phasen anzeigen. Bei der Gegenstromverteilung mit ihrer Vielzahl von Verteilungsschritten wären dann zwei (oder mehrere) gut getrennte Proteinmaxima zu erwarten. Die spezifische Aktivität der einzelnen Proteinfraktionen in Bezug auf verschiedene Markerenzyme wäre jedoch ähnlich.

Der zweite Fall, ähnliche Affinität verschiedener Membranen für die einzelnen Phasen, würde zu mehr oder minder eng zusammenliegenden Proteinmaxima führen, die allerdings eindeutig mit verschiedenen Markerenzymen korreliert wären. In diesem Fall wäre lediglich die Auflösung bei den verwendeten Batch-Prozeduren nicht ausreichend, und die Reinigung könnte durch eine Erhöhung der Verteilungsschritte verbessert werden.

Die Ergebnisse der Gegenstromverteilung deuten auf die dritte Möglichkeit hin: Das Fehlen auch der geringfügigsten Trennung entweder zwischen verschiedenen Markerenzymen oder Membranen verschiedenen Ursprungs, angezeigt durch Proteinmaxima, erklärt die schlechten Ergebnisse in den zweistufigen Batch-Experimenten. Die Wanderung des gesamten Proteins zu den mittleren Fraktionen macht es wahrscheinlich, daß keine der in der Probe enthaltenen unterschiedlichen Membranen eine spezifische Affinität für eine der beiden Phasen aufwies.

Die experimentellen Bedingungen in diesem Versuch könnten verbessert werden. Es wäre vielleicht möglich, mit verschiedenen Kombinationen von Polymer- und Salzkonzentrationen in einem 120-Kammer-Gerät eine Trennung der beiden

Markerenzyme zu erzielen. Der große Vorteil der "Phase partition"-Technik gegenüber der Dichtegradientenzentrifugation liegt jedoch in der höheren Geschwindigkeit, die in einem Batch-Experiment mit zwei oder drei Schritten erreichbar ist. Dieser Vorteil ist bei einer Verteilung mit 120 Schritten nicht mehr gegeben.

Die in einer Gegenstromverteilung mit mehr als 100 Schritten optimierten Bedingungen wären ferner nicht unbedingt in Batch-Experimenten mit 16ml-Systemen anwendbar. Eine Erhöhung der Zahl der Verteilungsschritte in diesen Experimenten wird bald durch die daraus resultierende niedrige Ausbeute limitiert (s. u.).

Bei höheren Pflanzen war es mit einer Dreistufen-Reinigung, wie sie von Widell und Larsson (1983a) angewendet wurde, möglich, die Plasmamembran von Blumenkohl in Bezug auf mitochondriale Membran 11fach gegenüber dem 50 000g-Ausgangsmaterial zu reinigen: Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der in diesem System verwendeten Membranmarker, endogene lichtinduzierte Absorptionsänderung für die Plasmamembran und Cytochromoxidase für mitochodriale Membranen, stieg von 0,17 im 50 000g-Niederschlag auf 1,8 in der gewaschenen Oberphase O_3. In der Unterphase U_3 fiel das Verhältnis auf 0,011; im direkten Vergleich der Aktivitäten unterscheiden sich die Phasen um den Faktor 160. Die spezifische Aktivität der Cytochromoxidase in der Oberphase war 36fach verringert und die lichtinduzierte Absorptionsänderung 4,3fach angereichert worden. Die Ausbeute betrug 1,76mg gereinigter Plasmamembran aus 90g Pflanzenmaterial.

Die Basis für diese Reinigung bildet die hohe Spezifität einzelner Membranen der Pflanzenzelle für die verschiedenen Phasen. In einem Gegenstromlauf mit Mais-Material und 57 Verteilungsschritten, ausgewertet in 18 vereinigten Fraktionen, korrelierte die Cytochromoxidase-Aktivität eindeutig mit einem Proteinmaximum in Fraktion 3. Jenseits von Fraktion 10 war keine CCO-Aktivität meßbar.

Dies zeigt eine starke Spezifität der Mitochondrienmembran für die (stationäre) Unterphase. Im Gegensatz dazu zeigte die lichtinduzierte Absorptionsänderung eine doppelte Verteilung mit Maxima in Fraktion 3 und 14. Da das Minimum bei Fraktion 10 lag, konnte der Teil dieser Aktivität, der eine spezifische Affinität für die Oberphase aufwies (mit der bewegten Oberphase zu den hinteren Fraktionen gewandert) von der Cytochromoxidase-Aktivität vollständig getrennt werden (Widell und Larsson 1981).

Ein Vergleich dieser Resultate mit denen der in E 2.3. beschriebenen Experimente zeigt, daß es weitaus schwieriger ist, die für die Reinigung von Mais-Plasmamembran entwickelte Technik an ein Pilzsystem wie Neurospora zu adaptieren als die Methode auf das Zellsystem einer anderen grünen Pflanze zu übertragen. Weder scheint die Plasmamembran des Pilzsystems eine Spezifität für die obere (PEG) Phase, noch die mitochondriale Membran eine eindeutige Affinität zur Unterphase zu besitzen.

Scarborough veröffentlichte 1975 eine Methode zur Reinigung der Plasmamembran der Neurospora-Mutante "slime" mit Hilfe von Concanavalin A. Die Struktur der Plasmamembran wurde zunächst durch Anlagerung des Lectins stabilisiert, und die Zellen wurden anschließend vorsichtig osmotisch lysiert. Die Membran-"ghosts" wurden dann durch niedertourige Zentrifugation sedimentiert und gereinigt. Diese Methode wurde in anschließenden Arbeiten, die der Charakterisierung der Plasmamembran-ATPase von Neurospora dienten, weiterentwickelt (Bowman und Slayman 1977; Stroobant und Scarborough 1979 a,b).

Die von Bowman und Slayman gereinigte PM-Fraktion enthielt 2% des Gesamtproteins und 33% der PM-ATPase, aber auch 3% der Succinatdehydrogenase- und 3% der mitochondrialen ATPase-Aktivität des Lysats. Die Plasmamembran war also

mit dieser Präparationsmethode etwa zehnfach gegenüber der mitochondrialen Kontamination gereinigt worden.

1978 gingen Bowman et al. dazu über, im Anschluß an eine vorgeschaltete enzymatische Verdauung der Zellwand die Plasmamembran des Neurospora-Wildtyps zu isolieren. Die mitochondriale Kontamination dieser Präparation wurde gegenüber der oben angeführten Arbeit geringfügig verringert.

In einer späteren Arbeit (Bowman et al. 1981) wurde mit einer modifizierten Methode eine 20-200fache Reinigung der Plasmamembran-ATPase gegenüber mitochondrialer ATPase erzielt. Die sauberste Plasmamembranfraktion, der 40 000g-Niederschlag des zweiten Homogenisationsschrittes, enthielt 2% der PM-ATPase-Aktivität, 1,7% des Proteins und 0,1% der mitochondrialen ATPase-Aktivität des Ausgangsmaterials. Die Werte beziehen sich auf den von groben Zellbruchstücken gereinigten 1 000g-Überstand.

Diese Membranisolierungen wurden mit Mycelmengen von 50-200g (Naßgewicht) und entsprechend großen Verdauungsansätzen durchgeführt. Bei meinen Versuchen, Membranisolierungen mit dieser am Wildtyp RL 21a etablierten Methode in kleineren Ansätzen (15-25g Mycel) mit der Albino-band-Mutante durchzuführen, gelang es mir jedoch nicht, Membranfraktionen des von Bowman et al. angegeben Reinheitsgrades zu erhalten.

D 3. Nitratreduktaseversuche

In einem Organismus können unter Umständen mehrere Blaulicht-gesteuerte Prozesse nebeneinander ablaufen, z. B. Induktion der Carotinoidsynthese (Bergmann et al. 1973) und Phototropismus der Sporangiophore bei Phycomyces (Delbrück und Shropshire 1960) oder die verschiedenen (Basis- und Spitzen-) Krümmungsreaktionen der Avena-Koleoptile. Die Steuerung der verschiedenen Photoreaktionen des Organismus

muß nicht notwendigerweise über ein- und dasselbe Rezeptorsystem erfolgen. Im Falle der Avena-Koleoptile wurde schon 1949 von Galston und Baker die Existenz verschiedener Blaulicht-Photorezeptoren für die einzelnen Krümmungsreaktionen diskutiert, der Phototropismus der Phycomyces-Sporangiophore wird möglicherweise ebenfalls durch mehrere Photorezeptoren gesteuert (Löser und Schäfer 1986).

Neurospora crassa zeigt im Licht neben der Induktion der Carotinoidsynthese (de Fabo et al. 1976) Phasenverschiebungen in der endogenen Rhythmik der Conidienbildung (Sargent et al. 1966), eine Unterdrückung der rhythmischen Conidienbildung durch Dauerlicht niederer Intensität (Sargent und Briggs 1967) sowie eine Stimulation der Conidienbildung durch Blaulicht unter Substratmangelbedingungen (Klemm und Ninnemann 1978).

Die verschiedenen Photoreaktionen von Neurospora reagieren bei Korrelationsstudien unterschiedlich auf Veränderungen der experimentellen Bedingungen (Klemm-Wolfgramm 1979; Paietta und Sargent 1981). Es ist daher wahrscheinlich, daß verschiedene Photorezeptorsysteme für die einzelnen Reaktionen verantwortlich sind. Ziel meiner Versuche war es, die Hypothese einer möglichen Beteiligung der Neurospora-Nitratreduktase am Prozeß der Photostimulation der Conidienbildung (Klemm und Ninnemann 1979) abzusichern bzw. zu entkräften.

Die Fähigkeit von Neurospora al-2 bd, nach Einsetzen von Hungerbedingungen (Substratmangel) Conidien zu bilden, ist abhängig von der Art der im Nährmedium angebotenen Stickstoffquelle: Auf Medium mit Nitrat als einziger N-Quelle wird der Stoffwechselweg der assimilatorischen Nitratreduktion in Anspruch genommen. Das Eingangsenzym dieses Stoffwechselweges, die Nitratreduktase (NR), ist unter diesen Umständen voll induziert.

Mycel, daß auf diesem "Nitrat-Medium" angezogen wurde, beginnt wenige Stunden nach Entzug des Nährmediums Conidien zu bilden. Im Gegensatz dazu kommt es bei Mycel, das auf gemischtem Ammonium-Nitrat-Medium angezogen wurde, erst später oder überhaupt nicht zur Conidienbildung (Klemm-Wolfgramm 1979). In diesem Fall wird der Stickstoffbedarf der Zellen weitgehend durch das im Medium vorliegende Ammonium gedeckt, die Nitratreduktase ist reprimiert.

Nitratreduktase von Neurospora enthält pro Molekül zwei Cytochrome vom b-Typ (b_{557}), zwei Flavine (FAD) sowie einen Molybdän-Cofaktor (Garrett und Nason 1967). Der Cofaktor enthält wahrscheinlich neben dem Molybdän noch ein Pterin-Derivat (Siefermann-Harms et al. 1985). Das Cytochrom b des teilweise gereinigten Enzyms kann durch Bestrahlung mit blauem Licht in vitro über die internen FAD-Gruppen reduziert werden (Ninnemann 1982). Dabei treten Absorptionsänderungen bei 423 und 553-557nm auf, wie sie von Muñoz und Butler (1975) an intaktem Neurospora-Mycel in vivo beobachtet worden waren. Die Nitratreduktase erfüllt also die Bedingungen eines potentiellen Flavin/Cytochrom-Photorezeptormoleküls.

Lichtinduzierte Absorptionsänderungen treten im intakten Mycel erst nach mehrstündigem Hungern der Probe in der optischen Küvette auf (Muñoz und Butler 1975, Klemm-Wolfgramm 1979). In der Neurospora-Mutante al-2 bd wird, ebenfalls unter Hungerbedingungen, die Conidienbildung durch Blaulicht stimuliert. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Lichtsteuerung dieses Prozesses und dem Auftreten der Absorptionsänderungen mit Maxima bei 423 und 557nm im Mycel in vivo (Klemm und Ninnemann 1978).

Aufgrund der Lage der Maxima ist es möglich, daß die im Mycel beobachteten Absorptionsänderungen zum Teil durch die prostethischen Gruppen der Nitratreduktase hervorgerufen werden. Da die Nitratreduktaseaktivität der Zellen eng mit der Fähigkeit des Mycels zur Conidienbilding zusammen-

hängt (s. o.), stellten Klemm und Ninnemann (1979) die Arbeitshypothese auf, daß die Photostimulation der Conidienbildung in der Albino-band-Mutante über Nitratreduktase als Schlüsselenzym erfolgen könnte.

Verschiedene Befunde lassen dabei für den Mechanismus der Signalumsetzung über die Photoreduktion eine Aktivierung des Enzyms denkbar erscheinen: Erstens kann die Nitratreduktase, zumindest in einigen höheren Pflanzen und Algen, in vivo in einer inaktiven Form vorliegen und teilweise durch Blaulicht aktiviert werden (Azuara und Aparicio 1983; Muñoz-Calvo et al. 1984); zweitens ist die künstlich inaktivierte Nitratreduktase von Neurospora zumindest in vitro durch Blaulicht reaktivierbar (Roldán und Butler 1980; Fritz und Ninnemann 1985). Zwar deuten die Befunde von Klein-Amy und Garrett (1980), die unter nicht induzierenden Bedingungen auch keine mit Antikörpern nachweisbare Nitratreduktase gefunden hatten, darauf hin, daß in vivo der Gehalt des Mycels an aktiver Nitratreduktase über die Regulation der Synthese eingestellt wird, es ist jedoch nicht sicher, ob eine inaktive Form der Nitratreduktase auch vom Antikörper erkannt wird oder ob neben einer Regulation auf Transkriptions/Translations-Ebene nicht in vivo auch eine Photoregulation der Aktivität unmittelbar am Enzym existiert.

Bei der Entwicklung des Untersuchungssystems versuchte ich, möglichst viele Parameter zu überprüfen und zu standardisieren. Für die Wahl von abfiltriertem Mycel an Stelle von Submerskulturen war entscheidend, daß 1) die Photostimulation der Conidienbildung bei al-2 bd bei "trockenem", d. h. nicht submers vorliegendem Mycel beobachtet worden war und 2) unter natürlichen Bedingungen ein substratverarmtes Mycel, in dem durch einen Photostimulus der Fortpflanzungsprozeß in Form von Conidienbildung in Gang gesetzt wird, ebenfalls an der Luft und nicht submers wächst.

Die Methode des Absaugens auf einem Membranfilter führte zu einem ebenmäßigen Mycelrasen, der gut zu Proben zu verarbeiten war. Die Anzuchtbedingungen sowie das zum Animpfen verwendete Conidienmaterial waren soweit wie möglich standardisiert worden. Dennoch variierte die im Mycel unmittelbar nach der Ernte gemessene Ausgangsaktivität der Nitratreduktase von Versuch zu Versuch. Es wurden an verschiedenen Versuchstagen Werte zwischen 800 und 1600 units/mg gemessen. Diese Schwankungen konnten auch durch gründliches Spülen der Kolben zur Entfernung etwaiger Spülmittelreste oder durch Verwendung von Kolben aus ein und derselben autoklavierten Mediencharge in mehreren Versuchen nicht verhindert werden. Um den tatsächlichen Grad der Substratverarmung einer Probe bestimmen zu können, wurde daher die in den Belichtungsreihen gemessene Aktivität der einzelnen Mycelstücke auf die jeweilige Ausgangsaktivität bezogen.

Ein weiteres Problem stellte die Streuung zwischen den im Laufe einer Versuchsreihe verwendeten einzelnen Mycelstücken dar. Obwohl das feinfädige Mycel vor dem Absaugen auf Membranfilter gut durchmischt wurde und die Mycelstücke während der Hungerbehandlung gleichmäßig ausgebreitet in kontrollierter Umgebung ruhten, traten mit fortschreitender Hungerzeit immer stärkere Unterschiede in der spezifischen Aktivität der einzelnen Segmente hervor. Eine Aussage war daher nur auf Grund von statistischer Auswertung möglichst vieler Einzelergebnisse möglich.

Das verbindlichere Kriterium für den physiologischen Zustand des Mycels und damit die Reaktivierbarkeit der Nitratreduktase schien eher die zum Zeitpunkt der Belichtung noch vorhandene Restaktivität als die unter Hungerbedingungen verbrachte absolute Zeit zu sein. Die spezifischen Aktivitäten der belichteten Proben und zugehörigen Dunkelkontrollen wurden daher mit der ursprünglich vorhandenen Ausgangsaktivität in Beziehung gesetzt.

Einer der Vorteile des Systems mit abfiltriertem Mycel lag darin, daß eine starke Erwärmung der Proben während der Belichtung auf Grund der geringen zu bestrahlenden Fläche leichter durch konstruktive Maßnahmen zu vermeiden war als bei einer Belichtung von Submers-Mycel im Anzuchtkolben. Die Erwärmung blieb mit 3°C relativ gering. Es wurden zwei Arten von Kontrollen durchgeführt: Die Dunkelkontrolle lag während der Belichtung entweder, in Aluminiumfolie verpackt, unter einer lichtdichten Abdeckung oder unmittelbar neben der Probe unter der Lampe.

Die erste Methode wurde gewählt, um eine eventuelle Belichtung der Kontrolle durch Streulicht mit Sicherheit ausschließen zu können. Durch die zweite Methode, Bestrahlung der Kontrollen parallel mit den Proben, sollte der Erwärmung während der Lichtbehandlung Rechnung getragen werden. Eine genau gleiche Erwärmung wie in den Proben konnte dabei nicht erreicht werden, da sich die Kontrolle aufgrund der reflektierenden Eigenschaften der Aluminiumfolie nur um 1-2°C erwärmte. Ein unmittelbarer Vergleich der beiden Kontrollmethoden in Belichtungsversuchen führte zu keiner statistisch signifikanten Differenz. Daher wurden Versuchsreihen mit beiden Arten von Kontrollen durchgeführt und die Daten getrennt ausgewertet.

Das gewählte Raster der Gruppeneinteilung für die statistische Auswertung stellt naturgemäß einen Kompromiß dar: Ein zu grobes Raster läßt den für die Photoreaktivierung effektivsten Bereich nicht mehr erkennen, das Gegenteil führt zu einer zu geringen Anzahl von Versuchsdaten in den einzelnen Gruppen. Die Daten wurden nach dem physiologischen Hungerzustand des Mycels, d. h. nach dem in der Dunkelkontrolle zum Zeitpunkt der Belichtung der Parallelprobe jeweils noch vorhandenen Prozentsatz der Ausgangsaktivität, in 10%-Schritten gerastert.

Die statistisch ausgewerteten Daten bestätigen den zu Beginn der Belichtungsversuche an Hand weniger Versuchsreihen gewonnenen Eindruck, daß in diesem System die Nitratreduktase offenbar dann am effektivsten auf die Belichtung reagiert, wenn die Aktivität auf etwa 20-50% der Ausgangsaktivität gefallen ist. Die statistische Signifikanz dieser Befunde liegt zwar in einem für biologisches Material akzeptablen Bereich, trotzdem scheint der Reaktivierungseffekt in den Versuchsreihen, bei denen die Kontrolle zusammen mit der Probe unter der Lampe lag, weniger ausgeprägt zu sein als bei den Versuchen, in denen die Kontrolle während der Belichtung separat aufbewahrt wurde. Für weitere Versuche scheint es daher notwendig, durch geeignete Filterkombinationen eine Erwärmung der Probe vollkommen auszuschalten.

Das Hauptproblem dieser Versuche, die Streuung des Versuchsmaterials, konnte trotz der Überprüfung und Standardisierung aller bekannten Parameter nicht überwunden werden. Die in den Vorversuchen durchgeführten Untersuchungen machen es sehr unwahrscheinlich, daß diese Schwankungen durch Variationen bei der Aufarbeitung oder bei der eigentlichen Nitratreduktasemessung hervorgerufen werden. Die Unterschiede scheinen im Mycel selbst zu liegen.

Schwer verständlich ist die Tatsache, daß bereits die Ausgangsaktivität des Mycels unmittelbar nach der Ernte an aufeinander folgenden Versuchstagen in diesem Ausmaß variiert, obwohl auf größtmögliche Konstanz der Anzuchtbedingungen geachtet wurde. Eine Inhomogenität des zum Animpfen verwendeten Conidienmaterials ist nicht anzunehmen. Möglich wäre eine Beeinflussung der wachsenden Zellen durch einen nicht erkannten variablen Parameter bei der Anzucht oder eine rhythmische Schwingung der NR-Aktivität innerhalb des Mycels. Eine solche Aktivitätsrhythmik mit einer Periodenlänge von Minuten bis zu Stunden könnte auch die Schwankungen erklären, die zwischen den

einzelnen Mycelproben eines Versuchstages mit dem Fortschreiten der Hungerzeit, d. h. wachsendem Abstand von dem möglicherweise synchronisierenden Prozeß der Ernte, immer stärker hervortreten.

Aufgrund der statistisch ausgewerteten Daten kann eine Photoreaktivierung von Neurospora-Nitratreduktase in vivo nicht ausgeschlossen werden. Die ermittelten durchschnittlichen Reaktivierungswerte in den einzelnen Gruppen erscheinen mit wenigen Prozent der Ausgangsaktivität zu gering, als daß ihnen mit Sicherheit eine physiologische Signifikanz zugesprochen werden könnte. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß diese niedrigen Reaktivierungen durch die Mittelwertbildung aller Versuchsdaten zustande kommen und daß die Werte der Einzelexperimente teilweise sehr viel höher liegen.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Die frei in den Zellen von Neurospora crassa vorliegenden Flavine sollten untersucht und identifiziert werden. Die Versuche wurden an der zellwandlosen Mutante "slime" durchgeführt. Die Messung der endogenen Flavine von N. crassa "slime" wird durch einen raschen Abbau von FAD im groben Zellhomogenat erschwert (Scheideler et al. 1984). Ich versuchte, Arbeitsbedingungen zu finden, unter denen dieser Abbau vermieden werden kann. Die beschriebene Aufarbeitungsmethode erlaubt die Trennung freier und gebundener Flavine bei geringstmöglicher artifizieller Freisetzung ursprünglich proteingebundener Flavine und die Identifizierung der einzelnen Flavinspezies ohne Beeinträchtigung durch die FAD-Abbaureaktion.

2) Es wurde versucht, die von Widell und Larsson (1981) bei der Reinigung von Mais-Plasmamembran angewandten "Phase partition"-Techniken an die Bedürfnisse des Pilz-Systems anzupassen. Durch planmäßige Variation der Versuchsparameter während der Phasentrennung, wie sie für eine Adaptierung der Methode an andere Versuchssysteme innerhalb des Bereichs der höheren Pflanzen (Widell und Larsson 1982; 1983 a, b) angewendet wird, gelang es nicht, eine zufriedenstellende Trennung der verschiedenen Neurospora-Membranen zu erzielen. Die Ergebnisse der Versuche deuten darauf hin, daß Plasma- und mitochondriale Membranen des Pilzes nicht die gleiche spezifische Affinität zu unterschiedlichen Phasen des Zweiphasen-Systems aufweisen wie die Membranen höherer Pflanzen.

3) Es wurde ein verbesserter Nitratreduktase-Aktivitätstest entwickelt. Das Phenazin Methosulfat/Ferricyanid- "Stop Reagenz" (Scheideler und Ninnemann 1986) macht eine arbeits- und zeitintensive Nachbehandlung der Proben überflüssig.

4) Die Photoreaktivierung der Nitratreduktase von Neurospora crassa wurde an substratverarmtem Mycel in vivo untersucht. Dazu wurde ein weitestgehend standardisiertes Versuchssystem für Reihenversuche an festen Myceltrasensegmenten entwickelt. Je nach dem Grad der Substratverarmung des Mycels erreichte die statistische Signifikanz der gemessenen Lichtreaktivierungen trotz der Inhomogenität des Versuchsmaterials teilweise 90-95%. Damit scheint eine physiologische Bedeutung dieser Photoreaktion für die Zellen möglich.

Literaturverzeichnis

Albertsson, P.-Å. Partition of cell particles and macromolecules, 2nd ed., Almquist and Wiksell, Stockholm and Wiley, New York, 1971

Azuara, M. P. and P. J. Aparicio: *In vivo* blue-light activation of *Chlamydomonas reinhardii* nitrate reductase. Plant Physiol. 71, 286-290, 1983

Bachmann, F. und F. Bergmann: Über die Wertigkeit von Strahlen verschiedener Wellenlänge für die phototropische Reizung von *Avena sativa*. Planta 10, 744-755, 1930

Bearden, J. C., Jr.: Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. Biochim. Biophys. Acta 533, 525-529, 1978

Bergman, K.: Blue-light control of sporangiophore initiation in *Phycomyces*. Planta 107, 53-67, 1972

Bergmann, K.; A. P. Eslava and E. Cerda-Olmedo: Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism. Mol. Gen. Genet. 123, 1-16, 1973

Blaauw, A. H.: Die Perzeption des Lichtes. Recueil Trav. Bot. Neerland. 5, 209-372, 1909

Bowman, B. J. and C. W. Slayman: Characterization of plasma membrane adenosine triphosphatase of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 252 No. 10, 3357-3367, 1977

Bowman, B. J.; S. E. Mainzer; K. E. Allen and C. W. Slayman: Effects of inhibitors on the plasma membrane and mitochondrial adenosine triphosphatases of Neurospora crassa. Biochim. Biophys. Acta 512, 13-28, 1978

Bowman, E. J.; B. J. Bowman and C. W. Slayman: Isolation and characterization of plasma membranes from wild type Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 256 No. 23, 12336-12342, 1981

Boysen-Jensen, P.: Die phototropische Induktion in der Spitze der Avena coleoptile. Planta 5, 464-477, 1928

Bünning, E.: Phototropismus und Carotinoide. I. Phototropische Wirksamkeit von Strahlen verschiedener Wellenlänge und Strahlungsabsorption im Pigment bei Pilobus. Planta 26, 719-736, 1937

Butler, W. L.: Absorption spectroscopy of biological materials. in: Methods in Enzymology 24B, A. San-Pietro, ed., Academic Press, New York, 3-25, 1972

Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976

Brain, R. D.; D. O. Woodward and W. R. Briggs: Correlative studies of light sensitivity and cytochrome content in Neurospora crassa. Carnegie Yearbook 76, 295-299, 1977a

Brain, R. D.; J. A. Freeberg; C. V. Weiss and W. R. Briggs: Blue light-induced absorbance changes in membrane fractions from corn and Neurospora. Plant Physiol. 59, 948-952, 1977b

Brooks, K. M.; R. Addison and G. A. Scarborough: Isolation and characterization of plasma membranes from strains of Neurospora crassa with wild type morphology. J. Biol. Chem. 258 No. 25, 13909-13918, 1983

Curry, G. M. and K. V. Thimann: Phototropism: The nature of the photoreceptor in higher and lower plants. in: Progress in Photobiology, B. C. Christensen and B. Buchmann, eds., Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1961

Darwin, C.: The power of movements in plants. Murray, London, 1880

deFabo, E. C.; R. W. Harding and W. Shropshire, Jr.: Action spectrum between 260 and 800 nanometers for the photoinduction of carotenoid biosynthesis in Neurospora crassa. Plant Physiol. 57, 440-445, 1976

Delbrück, M. and W. Shropshire, Jr.: Action and transmission spectra of Phycomyces. Plant Physiol. 35, 194-203, 1960

Emerson S.: Slime - A plasmodioid variant of Neurospora crassa. Genetica 34, 162-182, 1963

Fritz, B. J. and H. Ninnemann: Photoreactivation by triplet flavin and photoinactivation by singlet oxygen of Neurospora crassa nitrate reductase. Photochem. Photobiol. 41 No. 1, 39-45, 1985

Galston, A. W.: Riboflavin-sensitized photooxidation of indoleacetic acid and related compounds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 35, 10-17, 1949

Galston, A. W. and M. E. Hand: Studies on the physiology of light action. I. Auxin and the light inhibition of growth. Am. J. Bot. 36, 85-94, 1949

Galston, A. W. and R. S. Baker: Studies on the physiology of light action. II. The photodynamic action of riboflavin. Am. J. Bot. 36, 773-780, 1949

Galston, A. W. and R. S. Baker: Studies on the physiology of light action. III. Light activation of a flavoprotein enzyme by reversal of a naturally occurring inhibition. Am. J. Bot. 38, 190-195, 1951

Garrett, R. H. and A. Nason: Involvement of a b-type cytochrome in the assimilatory nitrate reductase of Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 1603-1610, 1967

Garrett, R. H. and A. Nason: Further purification and properties of Neurospora nitrate reductase. J. Biol. Chem. 244, 2870-2882, 1969

Green, D. E.; S. Mii and P. M. Kohout: Studies on the terminal electron transport system. I. Succcinic Dehydrogenase. J. Biol. Chem. 217, 551-567, 1955

Gressel, J.: Blue light photoreception. Photochem. Photobiol. 30, 749-754, 1979

Harper, J. F.: Peritz' F Test: Basic program of a robust multiple comparison test for statistical analysis of all differences among group means. Comput. Biol. Med. 14 No. 4, 437-445, 1984

Hertel, R.; A. J. Jesaitis, U. Dohrmann and W. R. Briggs: In vitro binding of riboflavin to subcellular particles from maize coleoptiles and Cucurbita hypocotyls. Planta 147, 312-319, 1980

Johansson, G.: Effects of salts on the partition of proteins in aqueous polymeric biphasic systems. Acta Chem. Scand. B28 No. 8; 873-882, 1974a

Johansson, G.: Partition of proteins and micro-organisms in aqueous biphasic systems. Molecular and Cellular Biochemistry 4 No. 3, 169-180, 1974b

Johnson, E. S.: Phototropic sensitivity in relation to wavelength. Smithson. Misc. Collect. 92, 1-17, 1934

Klein-Amy, N. and R. H. Garrett: Repression of nitrate reductase activity and loss of antigenically detectable protein in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 144 No. 1, 232-237, 1980

Klemm, E. and H. Ninnemann: Detailed action spectrum for the delay shift in pupae emergence of Drosophila pseudoobscura. Photochem. Photobiol. 24, 369-371, 1976

Klemm, E. and H. Ninnemann: Correlation between absorbance changes and a physiological response induced by blue light in Neurospora. Photochem. Photobiol. 28, 227-230, 1978

Klemm, E. and H. Ninnemann: Nitrate reductase - a key enzyme in blue light-promoted conidiation and absorbance change in Neurospora. Photochem. Photobiol. 29, 629-632, 1979

Klemm-Wolfgramm, E.: Korrelation zwischen Absorptionsänderungen und physiologischer Wirkung von Blaulicht bei Neurospora - Nitratreduktase als möglicher Photorezeptor. Doktorarbeit, Tübingen, 1979

Kornberg, A. and W. E. Pricer, Jr.: Nucleotide Pyrophosphatase: J. Biol. Chem. 182, 763-778, 1950

Koziolowa, A. and J. Koziol: A new method of isolation of natural flavins using phenol type resins. J. Chromatogr. 34, 216-221, 1968

Leong, T.-Y. and W. R. Briggs: Partial purification and characterization of a blue light-sensitive cytochrome-flavin complex from corn. Plant Physiol. 67, 1042-1046, 1981a

Leong, T.-Y.; R. D. Vierstra and W. R. Briggs: A blue light-sensitive cytochrome-flavin complex from corn coleoptiles. Further characterization. Photochem. Photobiol. 34, 697-703, 1981b

Löser, G. and E. Schäfer: Are there several Photoreceptors involved in phototropism of Phycomyces blakesleeanus? Kinetic studies of dichromatic irradiation. Photochem. Photobiol. 43 No. 2, 195-204, 1986

Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough, A. L. Farr and J. R. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951

Mitsuda, H.; H. Tsuge; Y. Tomozawa and F. Kawai: On the enzymatic hydrolysis of FAD in spinach leaves. J. Vitaminol. 16, 31-38, 1970

Muñoz-Calvo, M. L.; M. Villaroya-Sanchez, M. Rodriguez-Lopez and P. J. Aparicio: In vivo inactivation of Chlorella nitrate reductase and its subsequent activation by blue light and nitrate. Plant Science Letters 36, 105-110, 1984

Muñoz, V.; S. Brody and W. L. Butler: Photoreceptor pigment for blue light responses in Neurospora crassa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58 No. 1, 322-327, 1974

Muñoz, V. and W. L. Butler: Photoreceptor pigment for blue light in Neurospora crassa. Plant Physiol. 55, 421-426, 1975

Nicholas, D. J. D. and A. Nason: in: Methods in Enzymology Vol. 3, Colowick, S. P. und N. O. Kaplan, eds., p. 983, 1957

Ninnemann, H.: Blue light photorezeptors. BioScience 30/3, 166-170, 1980

Ninnemann, H.: Photoreduction of cytochrome b_{557} of partially purified Neurospora nitrate reductase via its internal flavin. Photochem. Photobiol. 35, 391-398, 1982

Paietta, J. and M. L. Sargent: Photoreception in Neurospora crassa: Correlation of reduced light sensitivity with flavin deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 No. 9, 5573-5577, 1981

Poff, K. L.; W. L. Butler and W. R. Loomis, Jr.: Light-induced absorbance changes associated with phototaxis in Dictyostelium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 813-816, 1973

Poff, K. L. and W. L. Butler: Absorbance changes induced by blue light in Phycomyces blakesleeanus und Dictyostelium discoideum. Nature 248, 799-801, 1974

Presti, D. und M. Delbrück: Photoreceptors for biosynthesis, energy storage and vision. Plant, Cell and Environment 1, 81-100, 1978

Rau, W.: Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. I. Das Wirkungsspektrum von Fusarium aquaeductuum. Planta 72, 14-28, 1967

Rilling, H. C.: On the mechanism of photoinduction of carotenoid synthesis. Biochim. Biophys. Acta 79, 464-475, 1964

Roldán, J. M. and W. L. Butler: Photoactivation of nitrate reductase from Neurospora crassa. Photochem. Photobiol. 32, 375-381, 1980

Sargent, M. L., W. R. Briggs and D. O. Woodward: Circadian nature of a rhythm expressed by an invertaseless strain of Neurospora crassa. Plant Physiol. 41, 1343-1349, 1966

Sargent, M. L. and Briggs, W. R.: The effects of light on a circadian rhythm of conidiation in Neurospora. Plant Physiol. 42, 1504-1510, 1967

Scarborough, G. A.: Isolation and characterization of Neurospora crassa plasma membranes. J. Biol. Chem. 250 No. 3, 1106-1111, 1975

Scheideler, L.: Nachweis und Identifizierung freier Flavine in Neurospora crassa. Diplomarbeit, Tübingen, 1980

Scheideler, L., B. Hahne and H. Ninnemann: Rapid degradation of FAD following lysis of Neurospora crassa cells: Consequences for evaluation of flavin composition in vivo. Neurospora Newsletter 31, 28-31, 1984

Scheideler, L. and H. Ninnemann: Nitrate reductase activity test: Phenazine Methosulfate-Ferricyanide stop reagent replaces postassay treatment. Anal. Biochem. 153, in Press, 1986

Siefermann-Harms, D.; B. Fritz und H. Ninnemann: Evidence for a pterin-derivative associated with the molybdenum-cofactor of Neurospora crassa nitrate reductase. Photochem. Photobiol. 42 No. 6, 771-778, 1985

Sonne, C.: Untersuchungen über Phototropismus. Strahlentherapie 31, 778-785, 1929

Stroobant, P. and G. A. Scarborough: Large scale isolation and storage of Neurospora plasma membranes. Anal. Biochem. 95, 554-558, 1979a

Stroobant, P. and G. A. Scarborough: Active transport of calcium in Neurospora plasma membrane vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 No. 7, 3102-3106, 1979b

Vogel, H. J.: A convenient growth medium for Neurospora. Microbiol. Genet. Bull. 13, 42-43, 1956

Weiss, B. and G. Turian: A study of conidiation in Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. 44, 407-418, 1966

Werner, W.; H.-G. Rey und H. Wielinger: Über die Eigenschaften eines neuen Chromogens für die Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-Methode. Fresenius' Zeitschr. f. analyt. Chem. 252, 224-228, 1970

Widell, S. and C. Larsson: Separation of presumptive plasma membranes from mitochondria by partition in an aqueous polymer two-phase system. Physiol. Plant. 51, 368-374, 1981

Widell, S.; T. Lundborg and C. Larsson: Plasma membranes from oats prepared by partition in an aqueous polymer two-phase system. Plant Physiol. 70, 1429-1435, 1982

Widell, S. and C. Larsson: Distribution of cytochrome b photoreductions mediated by endogenous photosensitizer or methylene blue in fractions from corn and cauliflower. Physiol. Plant. 57, 196-202, 1983a

Widell, S.; R. J. Caubergs and C. Larsson: Spektral characterization of light-reducible cytochrome in a plasma membrane-enriched fraction and in other membranes from cauliflower inflorescences. Photochem. Photobiol. 38, 95-98, 1983b

Wolken, J. J.: Photoreceptors and photoresponses in the living cell. in: Excited states in organic chemistry and biochemistry, B. Pullmann and N. Goldblum, eds., D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 175-186, 1977

Yagi, K.: Chemical determination of flavins. in: Methods of Biochemical Analysis Vol. 10, D. Glick, ed., 319-356, 1962

Zenk, M. H.: Untersuchungen zum Phototropismus der Avena-Koleoptile: I. Photooxydationen in vivo. Z. Pflanzenphysiol. 56, 40-56, 1967a

Zenk, M. H.: Untersuchungen zum Phototropismus der Avena-Koleoptile: II. Pigmente. Z. Pflanzenphysiol. 56, 122-140, 1967b

L E B E N S L A U F

Persönliche Daten

geboren am	26. November 1954
in	Düsseldorf
Eltern	Ilse Scheideler, geb. Kruse, Hausfrau
	Georg Scheideler, Kfm. Angest.

Ausbildung

1960 - 1964	Christoph-Steinmeyer-Volksschule in Düsseldorf
1964 - 1973	Lessing-Gymnasium, Düsseldorf (mathematisch-naturw.)

Wehrdienst 1.7.1973-30.9.1974

WS 1974	Beginn des Biologiestudiums an der Ruhr-Universität Bochum
SS 1977	Studienplatzwechsel an die Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Sept. 1980	Diplom in Biologie
Okt. 1980-Mai 1986	Promotion am Institut für Chemische Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. H. Ninnemann über das Thema "Blaulichtphotorezeption und Versuche zur Lichtreaktivierung von Nitratreduktase bei Neurospora crassa".

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Amrhein, Bentrup, Curio, Forth, Fortnagel, Glitsch, Hamann, Harder, Harms, Keyl, Langer, Lüttgau, Mergner, Ninnemann, Oberwinkler, Pfaff, Rautenberg, Schwarzkopff, Schwemmle, Traut, Trebst, Winkler, Zenk und Zinkler.